

# **Universidad de Buenos Aires**

## **Facultad de Farmacia y Bioquímica**

Lugar de realización: División de Bioquímica Nuclear, Departamento de Radio  
Biología, Centro Atómico Constituyentes, Comisión Nacional de Energía  
Atómica. San Martín, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

### **Rol del 2- Iodoheptadecanal en el Mecanismo de Autorregulación de la Glándula Tiroidea.**

Autor

**Lic. Rossich, Luciano Esteban**

**Director: Dr. Juvenal, Guillermo Juan**

**Directora Adjunta: Dra. Thomasz, Lisa**

**Consejera de Estudios: Dra. Mesch, Viviana**

**Año: 2016**

**Sólo hay un bien: el conocimiento.  
Sólo hay un mal: la ignorancia.  
(Sócrates)**

## **Agradecimientos**

Un especial agradecimiento es para mi Director de Tesis Dr. Guillermo J. Juvenal, quien me ha brindado la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación y me ha guiado a lo largo de este camino hasta alcanzar mi objetivo personal hoy hecho realidad.

Un gran agradecimiento a mi Directora Adjunta Dra. Lisa Thomasz por brindarme su conocimiento y acompañarme siempre en la búsqueda del saber.

A mi consejera de Estudios Dra. Viviana Mesch por sus correcciones y sugerencias.

Agradezco al Dr. Ramón Pizarro Jefe del Dpto. de Radiobiología por brindarme sus sabias y honorables palabras.

También agradezco a los Drs. Alejandra Dagrossa, Cristina Costa, Mario Pisarev, Ruben Fernandez y Oscar Opezzo por el apoyo y consejos otorgados.

A mis compañeros de laboratorio Marina, Leonardo, Romina, Carla, Marina, Sabrina, Roberto, Florencia, Juan, Gastón, Agustina, Magdalena, Patricia, Mabel y Mariana por las incontables horas de charla.

A mis amigos de la vida Gabriel, Lucas y Gastón por siempre estar dispuestos a compartir y ayudar.

Otro especial agradecimiento es para mi padre, mi madre y mi hermana que siempre han sabido brindar su apoyo incondicional.

Por último, el mayor e indudable de mis agradecimientos es para Bárbara y Giuliana por permitirme soñar junto a ellas y juntos ir por el camino de la vida.

El presente trabajo doctoral fue realizado en dependencias de la División Bioquímica Nuclear, Dpto. de Radio biología, Centro Atómico Constituyentes, Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA).

El mismo se llevó a cabo durante el desempeño de la Beca de Doctorado otorgada por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT, FONCYT) y la Beca Interna Tipo II otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Los subsidios que soportaron dicho trabajo fueron financiados por la CNEA, el CONICET (PIP 00838/2009 y 0219/2012) y la ANPCYT (PICT 1638/2007 y PICT 0038/2011).

## **Abreviaturas**

**2-IHDA:** 2-iodohexadecanal

**aa:** amino ácido

**AIT:** *Apical iodide transporter*

**AMPc:** Adenosina mono fosfato cíclico

**ATG:** códon de inicio de la traducción

**ATPasa:** Adenosina trifosfatasa

**BSA:** *Bovine serum albumin*

**bZIP:** *Basic Leucine Zipper Domain*

**ChIP:** Inmunoprecipitación de cromatina

**CRE:** *Cyclic AMP Responsive Element*

**CREBp:** *CRE-Binding protein*

**CREM:** *CRE- Modulator*

**CRE-L:** *CRE-Like*

**D1:** Deshalogenasa 1

**DAG:** Diacil glicerol

**Dehal-1:** Deshalogenasa de iodotirosinas

**DIT:** Diiodotirosinas

**DMEM:** *Dulbecco's modified eagle medium*

**DMSO:** Dimetil sulfoxido

**DNA:** Acido desoxirribonucleico

**DNAasa:** Acido desoxirribonucleasa

**DUOX1-2:** Dual oxidasa 1-2

**DUOXA 1-2:** Factor de maduración de DUOX1-2

**DREAM:** *Downstream regulatory element antagonist modulator*

**EGF:** *Epidermal Growth Factor*

**ERK:** *Extracelulllar signal-regulated kinase*

**ESM:** Error estandar de las medias

**FoxE1:** *Forkhead box E1*

**FRTL-5:** *Fisher Rat Thyroid Line 5*

**GADPH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**GATA-6:** *Guanine-Adenine-Timidine-Adenine, binding factor 6*

**<sup>3</sup>H-DOG:** <sup>3</sup>H- Desoxiglucosa

**HMP:** Hexosa monofosfato

**HNF-3:** *Hepatocyte nuclear factor-3*

**HPLC:** *High performance liquid chromatography*

**HRP:** *Horseradish peroxidase*

**HT:** Hormonas tiroideas

**HT-29:** *Human Tumor cell line 29*

**I-HO-A:** 14-iodo-15-hidroxi-6-ácido eicosatrienoico

**IGF-1:** insulino-simil tipo 1

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IL-8:** 6-iodo-11,14-eicosatrienoico - -lactona

**IP3:** Inositol trifosfato

**KRB:** *Krebs-Ringer buffer*

**MAPK:** *Mitogen activated protein kinases*

**MCF-7:** *Michigan Cancer Foundation-7 breast cancer cell line*

**MIT:** Monoiodotirosina

**Mir 138:** micro ARN 138

**MMI:** Metilmercaptoimidazol

**MTT:** 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromuro

**NADPH oxidasa:** Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato

**Nf-1:** Factor nuclear 1

**NF- $\kappa$ :** *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

**Nis:** *Sodium iodide symporter*

**Nkx2-1:** *Thyroid transcription factor 1*

**NUE:** *Nis- Upstream Enhancer*

**NR:** Receptor nuclear

**LB:** *Lysogeny broth medium*

**Let-7f:** *Letal- 7f microRNA*

**ONPG:** Orto-nitrofenil-beta- galactosido

**Oct-1:** *Octameric sequence ATGCAAAT binding factor 1*

**Pax-8:** *Paired box -8*

**PBS:** *Phosphate buffer saline*

**PCR:** Reacción en cadena de polimerasa

**Pds:** Pendrina

**PIP2:** Fosfatidil inositol difosfato

**PKA:** Proteína kinasa A

**PKC:** Proteína kinasa C

**PMA:** Acetato de forbol miristato

**PMSF:** *Phenylmethylsulfonyl fluoride*

**PPAR:** *Peroxisome Proliferative Activated Receptor*

**PPARa:** PPAR alfa

**PPARb:** PPAR beta

**PPARg:** PPAR gamma

**PPER X3- TK Luc:** *PPAR element response 3X- thymidine kinase promoter*

**Prom. Prox:** Promotor proximal

**PTU:** Propil TioUracilo

**qRT-PCR:** *quantitative reverse transcriptase- polimerase chain reaction*

**rEGF:** Receptor de EGF

**rFGF:** Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos

**rIGF:** Receptor del factor tipo insulina

**RIPA:** *Radioimmunoprecipitation assay buffer*

**RNA:** Acido ribonucleico

**RNAasa:** Acido ribonucleasa

**RNAi:** RNA de interferencia

**RNA<sub>m</sub>:** RNA mensajero

**rTGF- :** Recetor del factor de crecimiento tumoral-

**RT-PCR:** Reverso trascripción de reacción en cadena de polimerasa

**RTK:** Receptor tirosin kinasa

**rTSH:** Receptor de TSH

**RXR:** Receptor de ácido retinoico

**SDS:** Dodecilsulfato sódico

**SDS-PAGE:** *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

**Ser:** Serina

**SFB:** Suero fetal bovino

**siRNA:** *small interference ribonucleic acid*

**Smad 3:** *Mothers Against Decantaplegic homolotipe tipe3*

**SOD:** Superoxido dismutasa

**T<sub>3</sub>:** 3,5,5' - triiodotironina

**T<sub>4</sub>**: 3,5,3',5'-tetraiodotironina

**TA**: Temperatura de Anillado

**TBG**: Proteína ligante de tiroxina

**TBS**: *Buffer* tris salino

**TBS-T**: *Buffer* tris salino-tween

**Tg**: Tiroglobulina

**TLC**: *Thin liquid chromatography*

**Tpo**: *Thyroid peroxidase*

**TRE**: *TSH-Responsive Element*

**TRH**: Hormona liberadora de TSH

**TSH**: *Thyrotrophic stimulating hormone* / tirotrófina



## **Resumen**

**Introducción:** El yodo juega un importante papel en la bioquímica y fisiología tiroidea. Si bien la TSH es el principal regulador de la función y crecimiento de la glándula tiroides, el contenido intratiroideo de yodo es un importante regulador de estos parámetros. El exceso de yodo revierte la acción ejercida por la TSH tanto *in vivo* como *in vitro*. A medida que el aporte de yodo aumenta, se incrementa la biosíntesis de las hormonas tiroideas. Sin embargo, cuando la concentración de yodo supera un cierto límite, se pierde la proporcionalidad entre ambos parámetros y se inhibe progresivamente la biosíntesis hormonal (efecto Wolff-Chaikoff). El bloqueo provocado por el yodo es temporal. Se ha demostrado que para que el yodo ejerza su acción autorregulatoria debe ser incorporado a moléculas orgánicas (Elemento XI). Se han postulado como intermediarios, lípidos iodados. Uno de ellos es el 2-yodo-hexadecanal (2-IHDA).

**Objetivo:** Estudiar los parámetros tiroideos regulados por el 2-IHDA tales como proliferación celular, función tiroidea y la expresión de genes específicos tiroideos y determinar la potencial función de la familia de receptores nucleares PPAR (*Peroxisome Proliferative Activated Receptor*) en el mecanismo de acción del 2-IHDA.

**Materiales y Métodos:** Células FRTL-5 fueron cultivadas y tratadas durante 24 y/o 48 h con dosis crecientes de KI, 2-IHDA. Se estudiaron distintos parámetros fisiológicos como viabilidad celular, captación y eflujo de  $^{125}\text{I}$ , captación de  $^3\text{HDOG}$ , niveles de  $\text{Ca}^{++}$  libre intracelular, producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Todos estos procesos fisiológicos de la célula tiroidea fueron analizados en asociación a las proteínas involucradas NIS, PDS, DUOX1, DUOX2, TPO y Tg, a nivel proteico (Western Blot), de RNAm (qRT-PCR) y actividad transcripcional de sus promotores. Así mismo se analizaron los factores de transcripción canónicos como PAX8, NKX2-1 y FOXE1 y su grado de asociación al DNA de los sitios definidos en las regiones promotoras a través de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Estudios desarrollados con plásmidos que expresan proteínas quiméricas permitieron determinar la activación específica de los subtipos de PPAR.

Mediante análisis informático se definieron sitios putativos de interacción con el ADN en las regiones promotoras de los genes *Nis*, *Tpo*, *Tg*, *Pax-8*, *Nkx2-1* y *Foxe1*, a través de ChIP se definió cual de los sitios putativos poseía actividad verdadera.

También se realizaron ensayos durante 24 h aplicando agonistas y siRNAs para *PPAR alfa* y *PPAR gamma*.

**Resultados:** El iodolípido generó una disminución de la captación de yodo, un aumento del eflujo del halógeno, inhibición de la captación de desoxiglucosa, efecto dual sobre la producción de peróxido de hidrógeno e inhibición de la proliferación. Bajo efecto del 2-IHDA se observó disminución de los niveles proteicos de NIS, TPO, Tg, PAX8 y FOXE1, aumento de NKX2-1 y efecto dual sobre DUOX2. Mismos resultados fueron observados por qRT-PCR y por medio de transfecciones transientes. Mediante ChIP se determinó que el 2-IHDA promueve una disminución de la interacción de PAX8 sobre las regiones promotoras de *Nis*, *Tg* y *Tpo* y un aumento de NKX2-1 y FOXE1.

Mediante transfecciones transientes con construcciones quiméricas se observó que el 2-IHDA promueve la activación de los subtipos alfa y gamma de los PPARs. Mediante ChIP se observó un aumento de la interacción de estos subtipos en los sitios putativos definidos *in silico* mediante la aplicación PROMO 3.0.

La utilización de agonistas específicos para cada uno de los subtipos además permitió diferenciar la acción específica que desarrolla el iodolípido a través de ellos. Es así que se observó que el 2-IHDA a través de la activación del PPAR alfa promueve una inhibición de *Nis* y *Foxe1*. El subtipo gamma desarrolla la inhibición de *Pax8* y *Tg*.

**Conclusión:** Los resultados obtenidos demuestran que el 2-IHDA sería el principal compuesto en la identidad del Elemento XI, y el mismo actúa en parte modulando la actividad de PPAR alfa y PPAR gamma.

# Índice

## Resumen

<b><u>Introducción</u></b>	1
<b>Filogenia</b>	1
<b>Ontogenia</b>	3
<b>Folículo tiroideo</b>	4
<b>Irrigación sanguínea</b>	5
<b>Inervación</b>	6
<b>Metabolismo tiroideo</b>	7
Metabolismo del iodo	8
Endocitosis y proteólisis	11
Deshalogenación de MIT y DIT	13
<b>Producción periférica de triiodotironina</b>	14
<b>Acción de las Hormonas Tiroideas</b>	15
<b>Regulación de la Función Tiroidea</b>	15
Acción de la Tirotrofina	16
Control de la expresión génica en la tiroides	18
Aspectos estructurales y funcionales de NIS	19
Aspectos estructurales y funcionales de TPO	22
Aspectos estructurales y funcionales de Tg	26
Aspectos estructurales y funcionales de Pendrina (PDS)	27
Aspectos estructurales y funcionales de DUOX1 y 2	28
Aspectos estructurales y funcionales de NKX2-1	31

Aspectos estructurales y funcionales de FOXE1 .....	33
Aspectos estructurales y funcionales de PAX8 .....	34
Iodo como regulador de la función y crecimiento tiroideo .....	35
6-iodo-11, 14-eicosatrienoici- -lactona (IL- ) .....	38
2-iodo-hexadecanal (2-IHDA) .....	41
<b>Receptores Proliferativos Activados por Peroxisomas (PPARs) .....</b>	<b>43</b>
<b><u>Objetivos</u> ... ..</b>	<b>47</b>
Objetivos específicos .....	47
<b><u>Materiales y Métodos</u> .....</b>	<b>49</b>
<b>A) Síntesis del 2-IHDA .....</b>	<b>49</b>
1) Síntesis de n-hexadecanal .....	49
2) Síntesis de 2-IHDA .....	49
<b>B) Efectos del 2-IHDA sobre el crecimiento de la célula tiroidea .....</b>	<b>50</b>
1) Estudio de la viabilidad celular por exclusión con azul de tripán .....	50
2) Estudio de la viabilidad celular por MTT .....	52
<b>C) Efectos de los iodolípidos sobre la función de la célula tiroidea .....</b>	<b>52</b>
1) Estudio de la captación de $^{125}\text{I}$ .....	52
2) Estudio del eflujo de $^{125}\text{I}$ .....	53
3) Estudio de la captación de desoxiglucosa - $^3\text{H}$ (DOG- $^3\text{H}$ ) .....	54
4) Estudio de la producción de $\text{H}_2\text{O}_2$ extracelular .....	54
5) Estudio de los niveles intracelulares de $\text{Ca}^{2+}$ libre .....	55
6) Estudio de las proteínas tiroideas .....	55
7) Estudio de los RNAm .....	59

7.1	Transcripción Reversa de Reacción en Cadena de Polimerasa (RT-PCR)	59
7.2	PCR convencional	60
7.3	PCR en tiempo Real	61
8)	Estudio de las regiones promotoras de los genes tiroideos	62
8.1	Generación de bacterias competentes	62
8.2	Transfección de bacterias E. coli DH-5	63
8.3	Amplificación de plásmidos	63
8.4	Transfección de células	64
9)	Estudio de la interacción de los factores de transcripción (PAX8, NKX2-1 Y FOXE1) con el DNA de genes tiroideos	65
9.1	Análisis por inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) – PCR en tiempo real	65
<b>D)</b>	<b>Estudio de la acción del 2-IHDA sobre la modulación de los PPARs y su efecto en genes tiroideos</b>	<b>69</b>
1)	Análisis de activación de los PPARs por el 2-IHDA	69
2)	Definición y estudio de los sitios putativos de interacción entre los PPARs y el DNA de las regiones promotoras de genes tiroideos	71
2.1	Análisis informático de los potenciales sitios de interacción de PPARa y PPARg sobre secuencias contiguo de genes tiroideos	71
2.2	Análisis de los sitios putativos de acción de los PPARs por ChIP- PCR en tiempo real	74
3)	Estudio de la modulación del ARNm por activación e inhibición de los PPARs	74

3.1 Estudio de la modulación del RNAm de los PPARs .....74	74
por medio de sus agonistas, 2-IHDA y RNA pequeños de interferencia (siRNAs)	
4) Estudio de la captación de $^{125}\text{I}$ .....77	77
por activación e inhibición de los PPARs	
<b>E) Estudio de la regulación epigenética de los genes .....78</b>	78
<b>tiroideos a través del estudio de la acetilación de H3</b>	
<b>por ChIP-PCR en tiempo real</b>	
<b>F) Análisis estadístico de los datos.....79</b>	79

## **Resultados .....80**

<b>A) Estabilidad del 2 IHDA .....80</b>	80
<b>B) Efectos del 2-IHDA sobre la proliferación de la célula tiroidea .....80</b>	80
<b>C) Efectos del iodolípido sobre la función de la célula tiroidea.....82</b>	82
1) Estudio de la captación de $^{125}\text{I}$ .....82	82
2) Estudio del eflujo de $^{125}\text{I}$ .....83	83
3) Estudio de la captación de desoxiglucosa - $^3\text{H}$ (DOG- $^3\text{H}$ ) .....84	84
4) Estudio de la producción de $\text{H}_2\text{O}_2$ extracelular .....85	85
5) Estudio de los niveles intracelulares de $\text{Ca}^{2+}$ libre.....86	86
6) Estudio de las proteínas tiroideas.....87	87
7) Estudio de los RNAm .....88	88
8) Estudio de las regiones promotoras de los genes tiroideos.....92	92
9) Estudio de la interacción de los factores de transcripción .....97	97
(PAX8, NKX2-1 Y FOXE1) con el DNA de genes tiroideos	
<b>D) Estudio de la acción del 2-IHDA sobre la modulación .....101</b>	101
<b>de los PPARs y su efecto en genes tiroideos</b>	
1) Análisis de activación de los PPARs por el 2-IHDA.....101	101

2) Definición y estudio de los sitios putativos de interacción entre los PPARs y el DNA de las regiones promotoras de genes tiroideos	103
2.1 Análisis informático de los potenciales sitios de interacción de PPARα y PPARγ sobre secuencias contiguo de genes tiroideos	104
2.2 Análisis de los sitios putativos de acción de los PPARs por ChIP- PCR en tiempo real	107
3) Estudio de la modulación del ARNm por activación e inhibición de los PPARs	112
4) Estudio de la captación de <sup>125</sup> I por activación e inhibición de los PPARs	122
<b>E) Estudio de la regulación epigenética de los genes tiroideos a través del estudio de la acetilación de H3 por ChIP-PCR en tiempo real</b>	123
<b><u>Discusión</u></b>	125
<b><u>Conclusiones</u></b>	144
A). Conclusiones específicas	144
B). Conclusión general	145
<b><u>Referencias bibliográficas</u></b>	147
<b><u>Publicaciones</u></b>	178
A) Publicaciones relacionadas al presente trabajo de tesis	178
B) Publicaciones como co-autor durante el transcurso de esta tesis	178

## **Introducción**

La glándula tiroides (griego: *thyre-eides*, en español: parecido a escudo) es una glándula endocrina identificada por el anatomista Thomas Wharton en 1656 y descrita en su texto *Adenographia*. En el humano está situada debajo de la glotis junto al cartílago tiroides sobre la tráquea y está formada por dos lóbulos en forma de mariposa, unidos por un istmo, a ambos lados de la tráquea (Figura 1). Su función primordial es la síntesis de hormonas tiroideas (HT), que son sintetizadas y almacenadas por el folículo tiroideo, a través de las cuales actúa como un regulador importante del metabolismo, el crecimiento y la morfogénesis. Por otra parte las células C sintetizan calcitonina la cual es la responsable de regular la concentración sérica de calcio y la fijación de dicho elemento a los huesos (Wolfe et al., 1974).

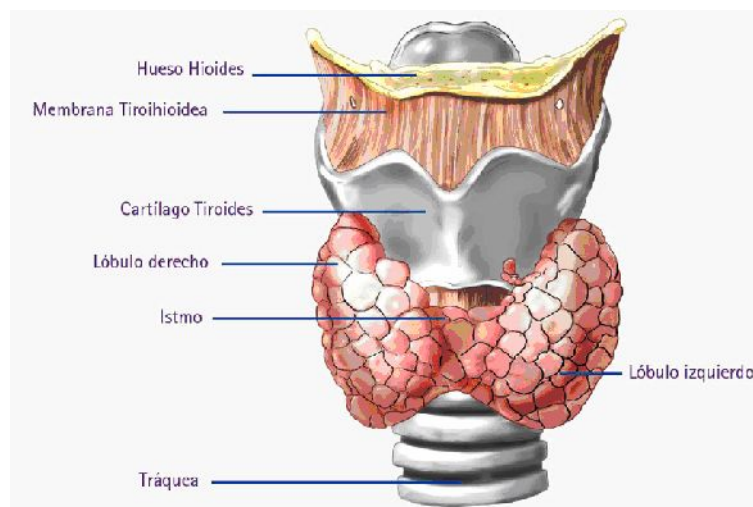
Las funciones de las células foliculares tiroideas varían de acuerdo a los períodos de la vida; juega un importante papel en el desarrollo embrionario, en el crecimiento y la maduración durante la infancia y la regulación del metabolismo en el organismo del adulto. Estas acciones se llevan a cabo mediante la producción de las HT, la tetraiodotironina o tiroxina ( $T_4$ ) y la triiodotironina ( $T_3$ ) que son derivados iodados del aminoácido tirosina.

### **Filogenia**

A lo largo de la evolución se ha desarrollado y mantenido la capacidad para captar iodo e incorporarlo a proteínas. Esta característica ha sido observada ampliamente tanto en el reino vegetal como animal. Las algas pardas poseen una



capacidad de acumular iodo  $10^6$  veces mayor a otras algas (Dumont et al., 2008), por ejemplo en *Laminaria digitata* hasta el 5% de su peso seco corresponde al contenido de iodo.



**Figura 1:** descripción de la glándula tiroides.

Dentro del reino animal se ha observado la captación de iodo y síntesis de HT tanto en vertebrados como invertebrados. En 1986 Drechsel determinó que los corales y las esponjas poseen importantes cantidades de iodo como iodotirosinas.

Se ha hipotetizado que a lo largo de la evolución, los organismos obtenían iodotirosinas y iodotironinas de su entorno pero que a lo largo del tiempo desarrollaron la capacidad de producir las HT a través del desarrollo de órganos. Las evidencias se hacen presentes en los protocordados como *ascidias* y *amphioxus* que poseen un órgano llamado endostilo capaz de producir HT y que es conservado hasta en vertebrados primitivos como la *Lamprey larvae*. Los vertebrados más

primitivos que poseen una glándula tiroidea compuesta por folículos son los peces sin mandíbula (agnatos).

La importancia de la obtención y producción de HT en el reino animal radica en que son esenciales para controlar el metabolismo, el consumo de oxígeno, regular la termogénesis, acumular lípidos de reserva como el colesterol y regular la metamorfosis en aquellos animales que la poseen (Eagleson & McKeown, 1978; Grau et al., 1981; Hulbert, 2000; Plisetskaya et al., 1983; Yen, 2001).

La importancia de esta glándula en el humano se pone de manifiesto cuando existe una alteración en su funcionamiento debido a que se puede generar retraso en el crecimiento, desarrollo y capacidad cognitiva. En adultos una deficiencia de HT promueve una baja de la tasa metabólica, el consumo de oxígeno, el metabolismo de proteínas, carbohidratos, vitaminas y lípidos.

## **Ontogenia**

La glándula tiroides se desarrolla en el embrión entre la semana 3 y 5 del embarazo y aparece como una proliferación del epitelio proveniente del endodermo sobre el piso faríngeo en la base de la lengua. Este divertículo se vuelve bilobular y desciende después de la cuarta semana de gestación adherido a la faringe por medio del conducto tirogloso. En el transcurso de las semanas siguientes, continúa migrando hasta la base del cuello, siempre conectado a la lengua por el conducto tirogloso, hasta la séptima semana cuando llega a su ubicación anatómica entre el tercer y sexto anillo traqueal. Los folículos de la tiroides comienzan a desarrollarse a partir de células epiteliales y logran captar iodo y producir coloide aproximadamente

a la semana 11 y producen  $T_4$  aproximadamente en la 18ª semana (Dumont et al., 2008).

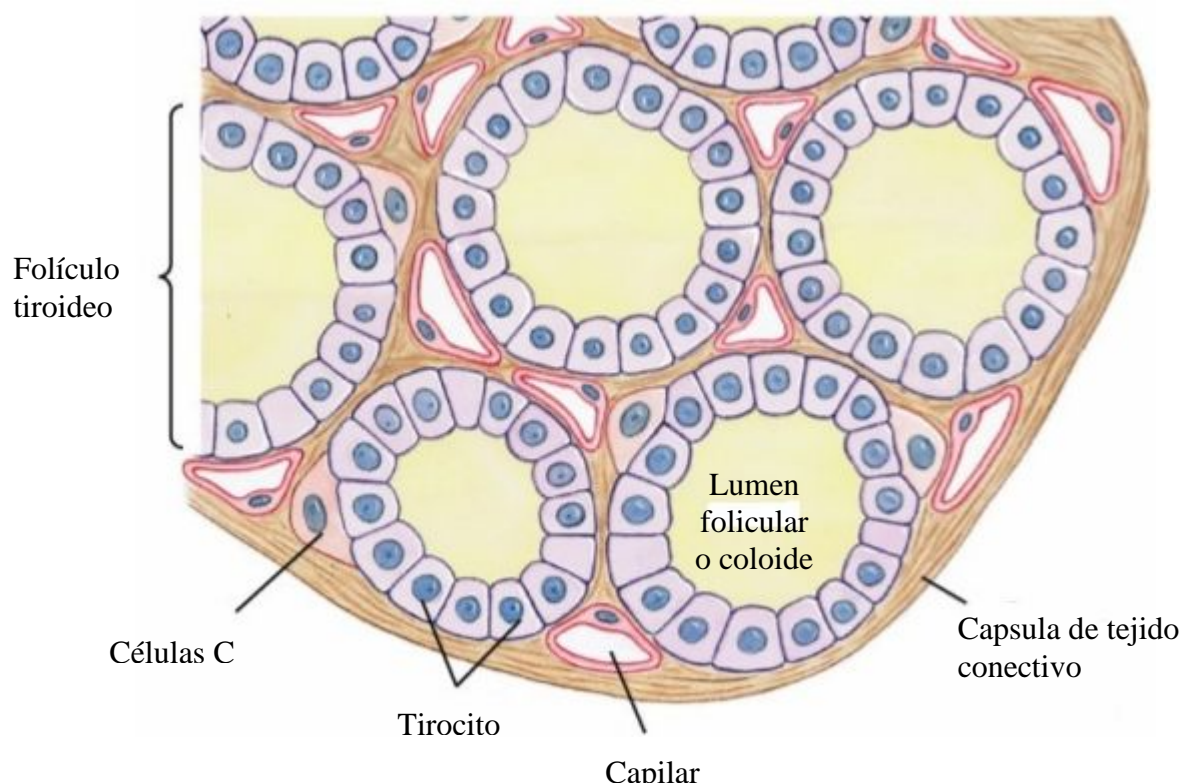
### **Folículo tiroideo**

La unidad anátomo-funcional de la glándula tiroides es el folículo tiroideo, el cual está compuesto por una monocapa de células foliculares que segregan y almacenan en el coloide (lumen del folículo) una glicoproteína iodada: la tiroglobulina (Tg).

El folículo tiroideo ocupa el 70% de la glándula, 20 % está ocupado por las células endoteliales de los vasos y el restante 10% corresponde a fibroblastos. Entre los folículos se encuentra el tejido intersticial donde transcurren vasos y nervios. La membrana basal de las células foliculares se encuentra en contacto con los capilares sanguíneos, mientras que la membrana apical está en contacto con el lumen folicular (Figura 2). Las células foliculares poseen forma cuboide, pero pueden achatarse si la célula está en reposo, y bajo la acción de la tirotrófina (TSH) crecen adquiriendo forma columnar (Santisteban et al., 2005). Se encuentran también células C, que secretan calcitonina tal lo comentado.

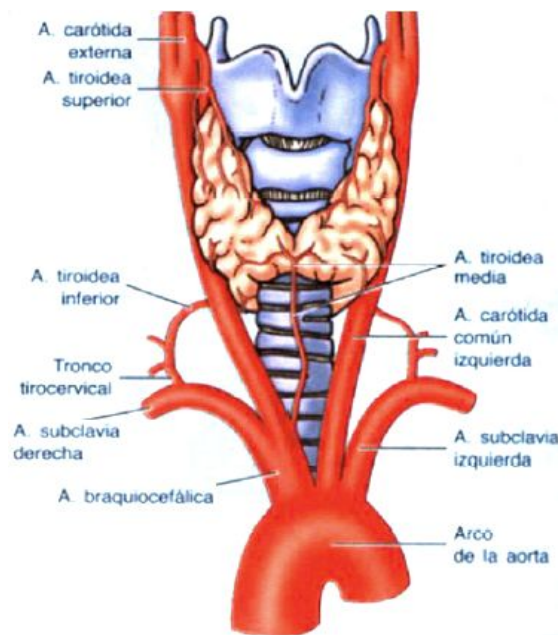
## Irrigación sanguínea

La irrigación sanguínea en la tiroides se ha estimado en aproximadamente 5 ml/g de tiroides por minuto. Esta abundante irrigación se promueve a través de las cuatro arterias mayores de la tiroides, el par superior de la carótida externa y el par inferior que se desprenden del tronco tirocervical de la subclavia (Figura 3). Entre estos vasos se produce una libre anastomosis que favorece aun más la irrigación. En adición a estas cuatro arterias, suelen desprenderse arteriolas de menor calibre desde el esófago y laringe hacia la cara dorsal de la glándula.



**Figura 2:** descripción del folículo tiroideo

Las venas emergen desde el interior de la glándula formando un plexo de vesículas debajo de la capsula. Estas derivan luego en la yugular interna, la braquiocefálica y ocasionalmente en la vena anterior yugular.



**Figura 3:** descripción de las arterias que irrigan la tiroides

## Inervación

La glándula tiroidea es inervada por fibras nerviosas tanto del sistema simpático como parasimpático del sistema nervioso autónomo. Las fibras simpáticas ingresan a la tiroides desde el ganglio cervical a lo largo de las venas mientras que las fibras parasimpáticas lo hacen desde el nervio vago y el nervio laríngeo. Se ha

determinado que los neurotransmisores tienen efecto directo sobre las células foliculares, pero su importancia varía de una especie a la otra. (Dumont et al., 2008).

### **Metabolismo tiroideo**

Las células tiroideas necesitan energía para realizar diferentes actividades como síntesis de nucleótidos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y funciones de transporte de sustancias, entre otras. La energía requerida por la célula es generada en un 85 % por las mitocondrias y en menor medida por la glucólisis aeróbica que se da en el citosol (Yaoita et al., 1990).

Es sabido que la principal fuente de recursos utilizados por las células tiroideas para llevar adelante la síntesis de ATP son los ácidos grasos libres. También se ha determinado que la vía de la glucólisis del ATP es la principal fuente de energía para realizar las funciones asociadas a la membrana plasmática. Es así que la inhibición de la glucólisis promueve una pronunciada disminución de la endocitosis del coloide (Buchholz et al., 2006).

Fue probado por Buchholz et al. (2006) que inhibidores de la mitocondria pueden abolir el efecto de la TSH sobre la respiración celular. En cambio la vía de la Adenosina Monofosfato cíclico (AMPC) no posee influencia directa sobre la respiración mitocondrial.

Otro recurso utilizado por la tiroides son los carbohidratos donde el 70 % de la captación de glucosa es transformada en lactato y un 5 % es catabolizada a través de la vía Embden-Meyerhoff y el ciclo de Krebs (Shi et al., 2002). Un 6% de los

carbonos de la glucosa son incorporados a proteínas y un 1% a lípidos y glucógeno. Alrededor del 10% restante es oxidado a través de la vía de la Hexosa Monofosfato (HMP) (Helbing et al., 2003; Das et al., 2006; Buchholz et al., 2006).

A través de la vía del HMP se genera NADPH y pentosas que son utilizadas en la producción de  $H_2O_2$ , el cual es requisito necesario para la oxidación y organificación del iodo en la síntesis de HT.

La TSH promueve un aumento selectivo de la vía del HMP probablemente a través de la vía del AMPc. Este nucleótido reproduce los mismos efectos de incremento de captación de glucosa y aumento de la producción de NADPH. Por el contrario, la TSH genera una disminución de la incorporación de los átomos de carbono de la glucosa en las proteínas y en los lípidos (Shi et al., 2002).

### **Metabolismo del iodo**

El iodo que ingerimos junto con los alimentos lo absorbemos en forma de yoduro a través del intestino en cantidades que oscilan entre los 100 y 300 mg/día. La glándula tiroidea tiene la capacidad de concentrar iodo y lo hace en una relación 20-40 veces mayor que el iodo circulante en plasma. El iodo es captado por la glándula en contra de un gradiente electroquímico (O'Neill et al., 1987), para ello utiliza una proteína cotransportadora de  $Na^+/I^-$  llamada NIS -*Natrium Iodide Symporter* (Weiss et al., 1984).

En 1984 Weiss y sus colaboradores demostraron que la TSH a través de la vía del AMPc tiene la capacidad de aumentar la captación de iodo y que ese efecto

puede inhibirse con drogas como el perclorato ( $\text{ClO}_4^-$ ) y el tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ) (Weiss et al., 1984).

El transporte del iodo desde el citosol hacia el lumen del folículo tiroideo se realiza a favor de un gradiente electroquímico. Existe evidencia de dos potenciales proteínas de membranas que permitirían el paso del halógeno hacia el lumen, la pendrina (PDS) (Royaux et al., 2000 y Yoshida et al., 2002) y el transportador apical de iodo (AIT) (Rodríguez et al., 2002). Cuando el halógeno arriba al lumen tiene lugar la organificación del mismo y consiguiente biosíntesis hormonal (Figura 4). Para ello, la glándula dispone de proteínas tales como la tiroglobulina (Tg), Dual oxidasa – 1 (DUOX1/THOX1), Dual oxidasa -2 (DUOX2/THOX2) y la tiroperoxidasa tiroidea (TPO).

La Tg es el sustrato principal para la formación de las HT, retiene el iodo al estar organificado y actúa como reserva ante una escasez repentina en la ingesta.

La oxidación del yoduro intratiroideo, iodinación de los residuos de tirosina de la Tg y el acoplamiento para formar las HT son reacciones catalizadas por la TPO (Tuarog, 2000). Esta enzima para llevar a cabo su reacción requiere de la estructura dimérica y glicosilada de la Tg (Lamas et al., 1974) y de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) como segundo sustrato el cual es sintetizado por la DUOX1 y DUOX2 (Cahmann et al., 1977; Virion et al., 1985).

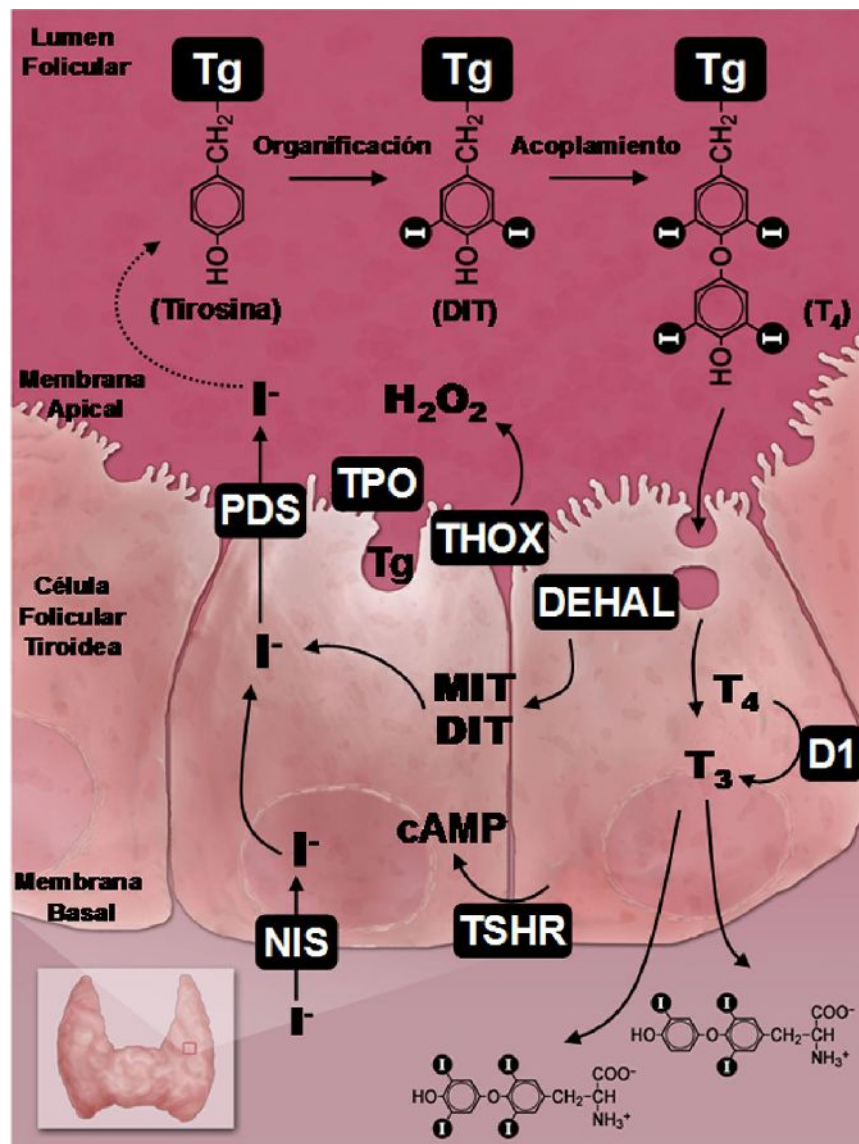


Para la iodinación de la Tg existen tres hipotéticos mecanismos:

- Mecanismo de radicales libres: el yoduro y el grupo tirosilo se oxidan generando los radicales  $I^{\cdot}$  y  $Tir^{\cdot}$ , que se unen para formar MIT (Taurog, 2000).
- Hipiodito como intermediario: se formaría como intermediario hipiodito que al reaccionar con  $H_2O_2$  liberaría  $O_2$ . En dicho caso la TPO desarrollaría su acción catalasa liberando  $O_2$  (Taurog, 2000).
- Formación del ion yoduro  $I^+$  como intermediario: el mecanismo sería la formación de  $I^+$  a partir de yoduro (Ohtaki et al., 1982).

Para la biosíntesis de hormonas tiroideas se sintetizan residuos mono-iodados y di-iodados de tirosina (MIT y DIT respectivamente). Posteriormente se produce el acoplamiento entre MIT y DIT o DIT y DIT para producir triiodotirosina ( $T_3$ ) y tetraiodotirosina ( $T_4$ ) respectivamente. La biosíntesis puede ser inhibida a nivel de la organificación-acoplamiento de las iodotirosinas por el tratamiento de la glándula con tiourea, tiouracilo, metiltiouracilo, propiltiouracilo (PTU) y metilmercaptoimidazol (MMI) entre otros compuestos denominados anti-tiroideos o bociógenos.

En la tiroides existen otros iodocompuestos además de las HT. La albúmina o tiroalbumina competiría, aunque pobremente, con la Tg por la halogenación. Así mismo, ha sido descrita la existencia de lípidos iodados (Gartner et al., 1996; Pereira et al., 1990; Pisarev & Gartner, 2000; Paneels et al., 2009)



**Figura 4:** descripción de la biosíntesis de hormonas tiroideas.

### Endocitosis y proteólisis de Tg

La glándula tiroides se diferencia de otros tejidos endocrinos por su capacidad de almacenamiento hormonal y la baja tasa de recambio, estimada en 1% diario. Esta característica de la tiroides permite un suministro prolongado, estimado entre 50 a 60 días ante el cese de la síntesis de HT (Larsen et al., 2008).

El primer paso en la liberación de las hormonas tiroideas es la endocitosis del coloide, principalmente mediante micropinocitosis con formación de pequeñas vesículas recubiertas en la membrana apical (Hatipoglu et al., 1999). Se ha propuesto que este proceso podría involucrar endocitosis mediada por receptor (Marino et al., 2000). Luego de ser internalizada, la Tg procedería a través de diferentes vías, en relación a su contenido de hormonas y carbohidratos. La vía principal sería llevada a adelante por la Tg con alto grado de maduración y gran contenido hormonal. Esto implica la fusión de los endosomas conteniendo Tg con lisosomas dando lugar a la formación de fagolisosomas, con subsecuente proteólisis de la Tg para la liberación de las HT (Figura 4).

En un proceso mediado por receptores, como el receptor de asialoglicoproteínas, las moléculas de Tg poco iodadas serían recicladas y transportadas hacia la membrana apical (Dun et al., 2001; Marino et al., 2000).

La megalina es un receptor que posee la capacidad de interaccionar con la Tg de bajo contenido hormonal y la transportaría por transcitosis hacia la membrana basal. De esta manera, la liberaría a circulación, evitando que Tg poco iodada compita en la vía de degradación lisosomal (Dun et al., 2001; Marino et al., 2000; Lisi et al., 2005).

En los fagolisosomas tienen lugar las reacciones de proteólisis de la Tg que producen HT libres y una total degradación de la estructura proteica. El proceso de degradación de la Tg podría generarse en dos pasos consecutivos, incluyendo en primer termino clivajes selectivos para liberar  $T_4$  y  $T_3$ , y luego procediendo a la total

degradación de la proteína (Arvan et al., 2005). Una vez liberadas  $T_4$  y  $T_3$ , su paso a través del citosol y hacia el plasma es considerado como un mecanismo de difusión simple ya que estas HT son propuestas como liposolubles.

Por el contrario, es sabido que estas hormonas poseen cargas en sus extremos proximal y distal, por lo que es posible que transportadores de hormonas tiroideas como MCT-8 y MCT-10 interaccionen con las HT en el pasaje a través de la membrana basal (Visser et al., 2008).

La deshalogenasa de iodotironinas tipo 1 (D1) es una selenoproteína localizada en la membrana basolateral de la célula folicular, capaz de producir la desiodinación de  $T_4$  en la posición 5' (Figura 4). Aproximadamente el 10% de la  $T_4$  es deshalogenada por la D1 logrando un incremento en la cantidad de  $T_3$  secretada respecto a la producida por clivaje de la Tg (Bianco & Kim, 2006; Gereben et al., 2008; Lauberg, 1984).

### **Deshalogenación de MIT y DIT**

Solo el 1% del contenido de yodo total en la tiroides se corresponde al yoduro intracelular a causa de su rápida organificación. Una parte del yoduro libre dentro del tirocito proviene de la acción de la deshalogenasa de iodotirosinas (DEHAL-1) sobre residuos de MIT o DIT clivados de la estructura de Tg.

DEHAL-1 se encuentra ubicada en la zona apical de la célula folicular y es una flavoproteína de membrana de 33 kDa, compuesta por 289 aminoácidos. Esta

enzima cataliza la deshalogenación de MIT y DIT dependiente de NADPH (Gnidehou et al., 2004). Cuando se produce la proteólisis de la Tg los residuos MIT y DIT que no fueron acoplados son liberados y posteriormente deshalogenados por DEHAL-1. El yoduro liberado es reciclado mediante incorporación al *pool* de yoduro intratiroideo y rápidamente reorganificado, aunque una mínima fracción retorna a circulación (Moreno et al., 2008).

### **Producción periférica de triiodotironina**

La tiroides secreta principalmente  $T_4$  que es considerada una prohormona al tener menor actividad biológica que la  $T_3$ . Alrededor de un tercio de la  $T_4$  secretada por la tiroides es convertida a  $T_3$  por desiodinación del anillo externo de la  $T_4$ . Este proceso tiene lugar en muchos tejidos periféricos que poseen enzimas con actividad 5' desiodasa de iodonitroninas, siendo los de mayor actividad por unidad de tejido el hígado y el riñón (Gereben et al., 2008).

Tres diferentes selenoenzimas con capacidad de deshalogenar iodonitroninas han sido identificadas y denominadas deshalogenasas de iodonitroninas tipo 1 (D1) - comentada anteriormente-, tipo 2 (D2) y tipo 3 (D3) (Gereben et al., 2008). La biodisponibilidad de las HT está dada por diferentes factores, entre ellos la secreción tiroidea de  $T_4$  y  $T_3$ , la activación de la prohormona  $T_4$  por D1 o D2 y la inactivación de  $T_4$  o  $T_3$  mediada por D3. Las HT modulan positivamente la actividad de D1 y D3, y de forma negativa sobre la D2. Por consiguiente, el aporte relativo de D1 y D2 a la generación periférica de  $T_3$  oscila en relación del estado fisiológico permitiendo la homeostasis del organismo (St Germain et al., 2009).

### **Acción de las hormonas tiroideas**

La  $T_4$  y la  $T_3$  son transportadas en sangre, casi en su totalidad, por proteínas transportadoras como la albúmina o la proteína ligante de tiroxina (TBG). Solo las hormonas libres poseen efecto biológico y la capacidad de difundir a través de la membrana citoplasmática. Una vez dentro de la célula se unen a diferentes receptores nucleares y modulan la transcripción de distintos genes blanco.

También se conocen efectos no genómicos de las HT, que difieren de los genómicos en que son respuestas rápidas y no se ven afectadas por inhibidores de la transcripción. Entre los efectos no genómicos está la regulación del transporte de  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y glucosa, la activación de la PKC, PKA y ERK/MAPK. Por otra parte las HT también participan regulando la función mitocondrial (Yen, 2001).

Las HT tienen efecto en casi todos los órganos y tejidos donde regulan numerosos procesos metabólicos tales como: consumo de oxígeno, termogénesis, balance mineral, síntesis y degradación de proteínas, hidratos de carbono y lípidos. Además, las HT son de vital importancia para la maduración ósea debido a que actúan sobre el cartílago de crecimiento y regulan la transcripción de la hormona de crecimiento.

### **Regulación de la función tiroidea**

La disponibilidad de niveles suficientes de HT es importante para el normal desarrollo y la homeostasis metabólica del organismo jugando un papel importante

en la estabilidad de los niveles de  $T_3$  y  $T_4$ , el almacenamiento hormonal en el coloide folicular y la gran versatilidad en la adecuación de la síntesis y secreción hormonal por la célula tiroidea (Larsen et al., 2008).

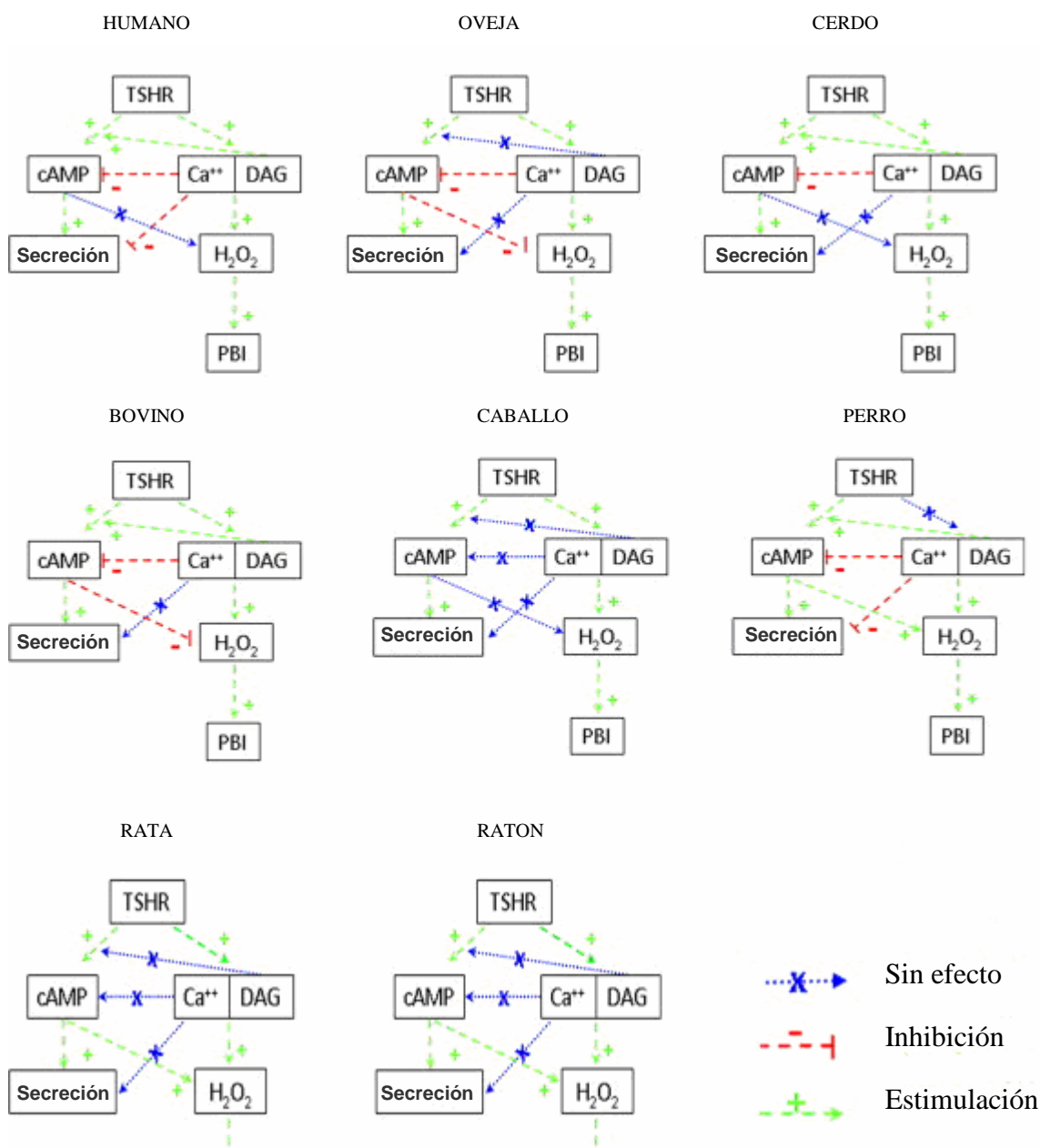
El proceso de regulación es modulado por un mecanismo de retroalimentación negativa del eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo. Por otra parte, dentro de la propia célula folicular tiroidea tienen lugar mecanismos de autorregulación que permiten mantener constante la producción de hormonas (Larsen, et al. 2008).

### **Acción de la Tirotrofina (TSH)**

La TSH es una hormona glicoproteica de origen hipofisiario y es la principal reguladora de la función tiroidea. La regulación de la síntesis y secreción de la TSH está regulada positivamente por la proteína TRH (proteína liberadora de TSH) y negativamente por las HT. Una vez en el torrente sanguíneo la TSH difunde hasta la tiroides donde interacciona con su receptor (rTSH) ubicado en la membrana basal del tirocito y promueve la activación de distintas vías dependiendo de la especie (Figura 5), principalmente la vía del AMPc y en menor medida la del inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) (Laurent et al., 1987; Van Sande et al., 1990). La actividad coordinada de estas vías de señalización promueve el correcto funcionamiento de las principales funciones diferenciadas de la glándula (Tabla 1).

Vía AMPc	Captación de yodo y síntesis de proteínas específicas tiroideas Aumento del metabolismo energético Aumento de la altura del epitelio glandular Disminución del tamaño del coloide folicular Mayor vascularización glandular Proliferación celular
Vía DAG	Producción de $H_2O_2$ Iodinación de la Tg

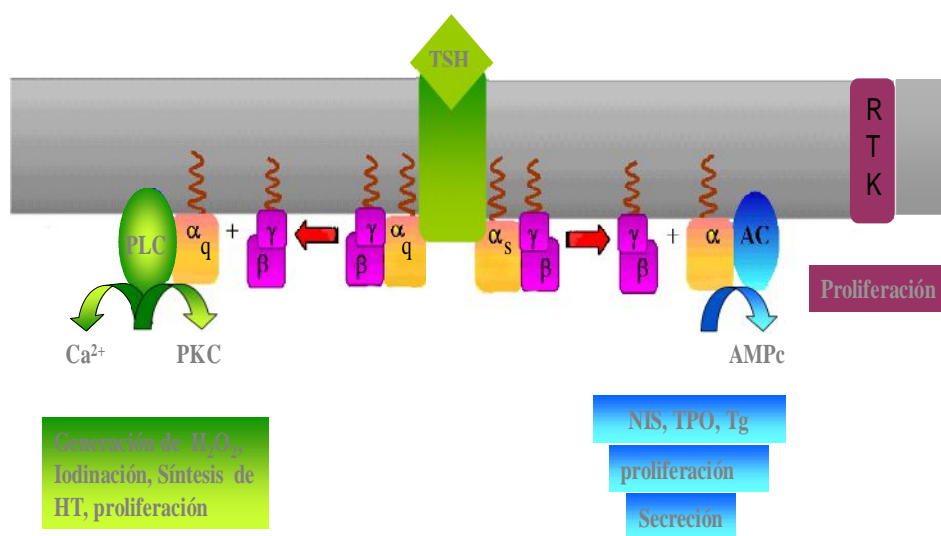
**Tabla 1:** vías de señalización que promueven las principales funciones diferenciadas de la glándula tiroides.



**Figura 5:** vías de acción de la TSH sobre su receptor en tiroides de distintas especies como humano, oveja, cerdo, bovino, caballo, perro, rata y ratón. Adaptado de Song et al., 2010.



En la membrana basal del tirocito, existen otros receptores de hormonas y factores de crecimiento que poseen actividad tirosina-quinasa y predominantemente tienen efecto sobre la proliferación celular (Figura 6). Algunos de los que se conocen hasta el momento son: el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr), el receptor del factor de crecimiento tumoral (TGF- $\alpha$ ), el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFr) y el receptor del factor tipo insulina (IGFr) entre otros.



**Figura 6:** representación de la activación por TSH de la vía Gq-PLC-Ca<sup>2+</sup>-PKC y de la vía Gs-AMPc-PKA.

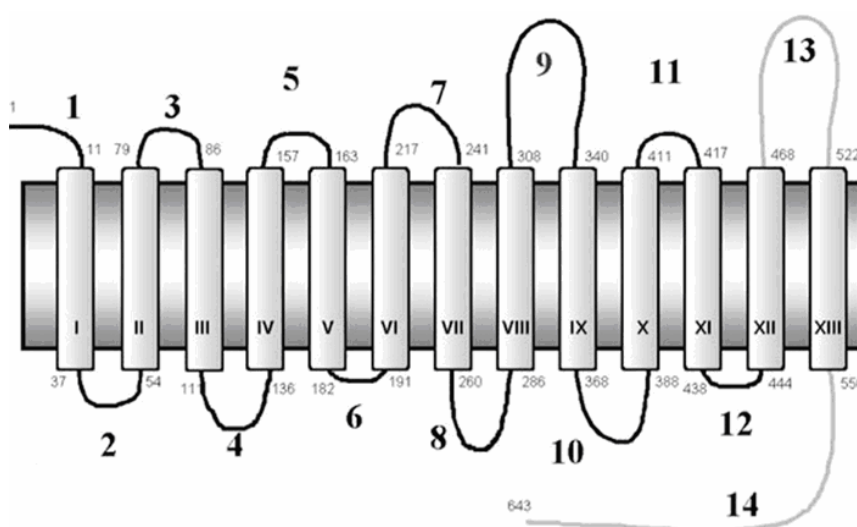
### Control de la expresión génica en la tiroides

Entre los genes tiroideos específicos encontramos proteínas únicamente expresadas en tiroides como la Tg y la TPO; otras proteínas tales como NIS, DUOX1, DUOX2, Pendrina (PDS) y el rTSH son expresadas también en otros

tejidos. La expresión de estos genes se encuentra regulada en parte por un grupo de factores de transcripción que si bien se expresan en otras partes del organismo, solo lo hacen en conjunto dentro de la glándula tiroidea. Ellos son el Nkx2-1 (Factor tiroideo de transcripción 1, también llamado TTF1 o TITF1); FOXE 1 (Factor tiroideo de transcripción 2, también llamado TTF-2) y PAX8 (*Paired box 8*). Dichos factores de transcripción se unen a distintos sitios del DNA, tanto en regiones promotoras proximales como distales.

### Aspectos estructurales y funcionales de NIS

NIS es una glicoproteína altamente hidrofóbica de 643 aminoácidos con 13 pasos transmembrana y un peso molecular de 108 kDa. El transporte de yoduro es un proceso activo dependiente del gradiente de sodio generado por la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, e involucra el movimiento conjunto de dos cationes sodio y un anión yoduro hacia el interior celular (Dohan et al., 2003; Dohan et al., 2007).



**Figura 7:** representación de la proteína del simportador de  $\text{Na}^+/\text{I}^-$ . Adaptado de Dohan et al., 2007.

La comprensión del mecanismo de regulación utilizado por la TSH a nivel transcripcional fue determinado a partir de la caracterización de la región promotora del gen *Nis*.

La descripción de la región promotora proximal del gen de rata (-420 a +1, respecto al inicio de la transcripción), demostró un escaso efecto de la TSH sobre un sitio consenso para NKX2-1 (-245 a -230) y un factor no identificado de respuesta a TSH denominado TRE (del inglés, **TSH-Responsive Element**) (-420 a -385) (Kogai et al., 2006) (Figura 8).

Luego se determinó que la regulación específica de *Nis* en tiroides de rata es dependiente de una región potenciadora presente en su región promotora conocida como *Nue* (***Nis upstream enhancer***), que posee sitios de unión para los factores de transcripción PAX8, NKX2-1 y una región relacionada al sitio consenso de respuesta a AMPc (- 2.495 a -2.264, respecto al inicio de la transcripción) (Figura 8). Esta región amplificadora permitió demostrar la capacidad de responder al estímulo de AMPc de forma dependiente e independiente de PKA.

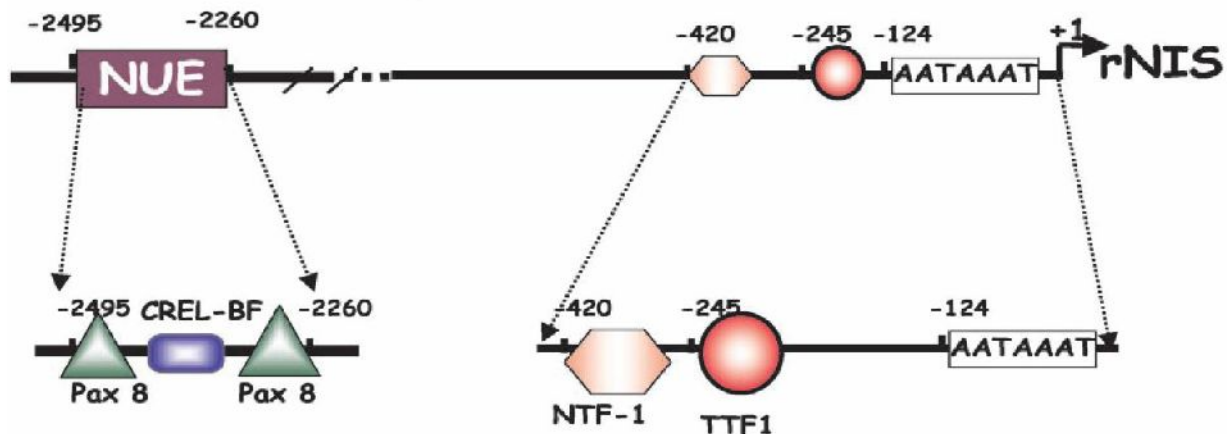
La transcripción de los genes Tg y TPO, si bien responden al estímulo de AMPc, no poseen regiones CRE (**Cyclic AMP Response Element**) características en su región promotora.

La caracterización de *Nue* permitió establecer una relación entre la expresión de NIS dependiente de TSH y la regulación ejercida por factores de transcripción específicos de tiroides. *Nue* contiene sitios de unión para NKX2-1 que no parecen afectar la expresión de *Nis*, sitios de unión a PAX8 y una región que presenta

similitud con las secuencias consenso del elemento CRE y del factor de transcripción AP1, denominada CRE-*Like* (CRE-L). Dicha región es capaz de unir diferentes factores de transcripción, entre ellos la proteína de unión CREBp (CRE-*Binding protein*), el modulador de CRE (CREM) y diferentes miembros de la familia con dominio básico en cierre de leucina (bZIP) (Chun et al., 2004; Fenton et al., 2008) (Figura 8).

La transcripción máxima del gen de NIS dependiente de la vía TSH/AMPC requiere de la presencia de al menos una de las secuencias consenso de PAX8 y de la integridad del sitio CRE-L (Chun et al., 2004). Ha sido demostrado que la región amplificadora *Nue* está presente y es funcional en ratón y humano (Kogai et al., 2006). Nicola et al., (2010) han demostrado que en *Nue* existe un sitio conservado en humanos, rata y ratón para NFKB y que el mismo interacciona y colabora con PAX8 en la expresión de *Nis*.

Se ha demostrado que la TSH posee un efecto modulador sobre la distribución y la estabilidad proteica de *Nis* a nivel postranscripcional (Riedel et al., 2001, Vadysirisack et al., 2007). Esto se determinó a partir del análisis de ratones hipotiroideos modificados genéticamente y carentes del receptor de TSH (TSHr-/-). Este modelo puso de manifiesto que en ausencia de la función de TSH sobre el tejido tiroideo la expresión de *Nis* no es evidente (Marians et al., 2002).



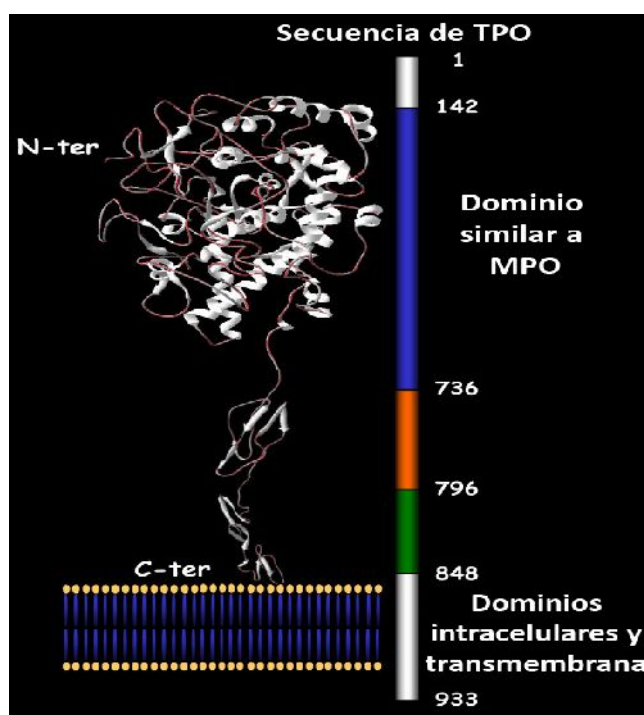
**Figura 8:** Esquema ilustrativo del promotor de *Nis* en rata. La figura representa la región descrita del promotor *Nis* mostrando el sitio del inicio de la transcripción, la caja TATA, la región promotora proximal (promotor mínimo) y la región amplificadora *Nue*. Se indica de manera aproximada la localización de los sitios de unión al promotor de NKX2-1, PAX8 y NTF1, así como de la secuencia CRE-L. Las posiciones indicadas son relativas el sitio de inicio de la transcripción denominado como +1. Esquema adaptado con modificaciones de Kogai et al., 2006.

### Aspectos estructurales y funcionales de TPO

TPO es una glicoproteína localizada en la membrana apical de las células foliculares tiroideas. Es imperativa para su actividad catalítica la unión covalente a un grupo prostético hemo. Su nivel de glicosilación es elemental para su normal actividad enzimática.

El gen de *Tpo* codifica una proteína de 933 aminoácidos y posee un peso molecular de 103 kDa (Figura 9). Se ha logrado obtener las secuencias completas del ADNc de *Tpo* porcino (Kimura et al., 1987), humano (Derwahl et al., 1989), de rata (Kotani et al., 1993) y ratón (Francis-Lang 1992). Dichas secuencias demuestran un alto grado de conservación a lo largo de la evolución, excepto en sus extremos N y C terminales.

El sitio activo de la proteína comprende una gran parte de la misma y se extiende hacia el lumen folicular. Una pequeña porción de la TPO es citoplasmática y sólo 25 aminoácidos constituyen su único segmento de transmembrana (McLachlan & Rapoport 1992, Ruf & Carayon 2006).



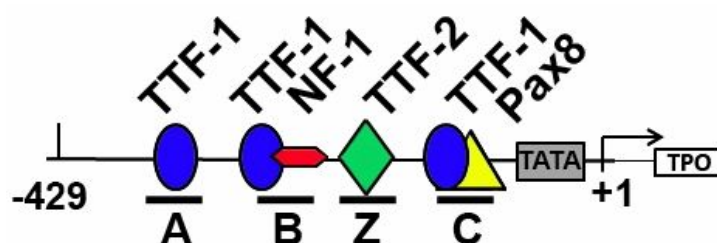
**Figura 9:** Representación esquemática de TPO donde se observa su orientación en la membrana apical. TPO es una enzima unida a membrana que presenta dos sitios reactivos, uno para tirosina y otro para yoduro. Las reacciones químicas catalizadas por TPO ocurren en la superficie de la membrana apical de la célula tiroidea y ocurren en presencia de  $H_2O_2$ . Esquema adaptado de Ruf y Carayon 2006.

Ensayos funcionales del promotor de *Tpo* realizados en la línea celular tiroidea de Rata Fisher, FRTL-5, demostraron que la región promotora mínima comprende alrededor de 420 pares de bases (pb) en dirección 5' corriente arriba.

Esta secuencia de DNA es suficiente para conferir la expresión específica de la proteína en la célula tiroidea (Figura 10) (Avbelj et al., 2007).

El estudio del promotor de *Tpo* ha llevado a subdividirlo arbitrariamente en distintas regiones. El segmento denominado A está constituido por un sitio de unión a Nkx2-1; la región llamada B está conformada por una secuencia en la que se solapan los sitios de unión para NKX2-1 y el factor nuclear 1 (NF1) (Rivolta et al., 2007), la región Z representa el sitio de unión a Foxe1 (Tenenbaum-Rakover et al., 2007); y la región C corresponde a la secuencia de solapamiento para la unión de los factores NKX2-1 y PAX8 (Kotani et al., 1999).

Tanto TSH como el factor de crecimiento insulino-símil tipo 1 (IGF-1) incrementan la actividad transcripcional de este promotor mínimo, de manera dependiente del tiempo y de la dosis empleada. El efecto de TSH es mimetizado por agonistas de AMPc, mientras que la inhiben activadores de la proteína quinasa C (PKC) o ésteres de forbol (Vassart & Dumont 1992, Kotani et al. 1999).



**Figura 10:** Esquema ilustrativo del promotor de TPO en rata. La figura representa la región descrita del promotor mínimo de TPO mostrando el sitio del inicio de la transcripción y la caja TATA. Se indica de manera aproximada la localización de los sitios de unión al promotor de NKX2-1, FOXE 1, NF1 y PAX8. Las posiciones de los factores de transcripción indicadas, son relativas al sitio de inicio de la transcripción denominado como +1. Esquema adaptado de Ortiz y col. 1999.

La regulación de la expresión génica de *Tpo* está modulada por los factores de transcripción nombrados previamente, NKX2-1, FOXE 1, PAX8 y NF-1.

FOXE 1 desempeña un papel principal en la respuesta del promotor de *Tpo* a la acción de TSH e IGF-1 (Kotani et al. 1999). Ha sido demostrado que la interacción de FOXE1 con el promotor de *Tpo* precede a su activación transcripcional y esto sucede simultáneamente con la generación de regiones altamente accesibles en la estructura de la cromatina de este promotor (Tenenbaum-Rakover et al., 2007).

Por otra parte, se ha observado que FOXE1 y NF1 son capaces de interaccionar físicamente entre sí, y que la orientación espacial de ambos sitios de interacción en el promotor de *Tpo* debe ser del mismo lado de la hélice para lograr la actividad transcripcional máxima (Rivolta et al., 2007).

Se ha reportado que FOXE1 por sí mismo es intrínsecamente un activador transcripcional débil (Aza-Blanc et al., 1993; Ortiz et al., 1997). Sin embargo, posee un rol principal en la mediación de la respuesta hormonal de *Tpo* puesto que permite que otros factores tengan acceso a la cromatina (Cuesta et al., 2007). Del mismo modo, fue demostrado que la proteína nuclear P300 participa como co-activador del factor de transcripción PAX8 en la regulación del promotor de *Tpo* en humanos. La interacción física entre ambas proteínas involucraría la región amino-terminal y el dominio CH3 de P300 y el dominio de transactivación de PAX8 en su porción carboxilo-terminal (De Leo et al., 2000). Otra proteína que interactúa y promueve la expresión de *Tpo* es NFK (Nazar et al., 2012).



### Aspectos estructurales y funcionales de Tg

Tg pertenece a una superfamilia de serinas hidrolasas y gran parte de la proteína está organizada en 19 repeticiones. El gen posee más de 200 Kb de extensión, con 48 exones y se ubica en el brazo largo del cromosoma 8 en humanos (Rousset & Dunn, 2004). Origina un transcripto de 8,5 kb y el 97% de las secuencias del gen corresponde a intrones (Rivolta et al., 2005).

La región del promotor mínimo del gen de la Tg es un fragmento de unas 200pb en el extremo 5', delante del sitio de iniciación de la transcripción, con el cual interaccionan distintos factores de transcripción entre los cuales encontramos a NKX2-1, FOXE1 y PAX8 (Abramowicz et al., 1990; Francis-Lang et al., 1992). Esta región promotora presenta tres sitios de unión para NKX2-1, uno para PAX8 y uno para FOXE1, un sitio para un factor ubicuo aún no identificado y un sitio para DREAM.

El sitio de interacción para PAX8 se solapa con uno de los sitios para NKX2-1. Estudios llevados adelante *in vitro* con vectores de expresión mostraron que PAX8 activa al promotor de Tg en forma más eficiente que NKX2-1 y que la expresión de PAX8 está bajo el control de TSH (Fabbro et al., 1998).

La región potenciadora (*enhancer*) presenta tres sitios de unión para NKX2-1, y en el humano se ha determinado la necesidad de un factor adicional, el cual es una proteína que se une a secuencias de tipo CRE. Al igual que para Tpo se ha observado la interacción entre PAX8 y el coactivador P300 (Di Palma et al. 2003).

Si bien no existe una región CRE, en ratas, la expresión del gen de *Tg* depende de los niveles circulantes de TSH (Van Heuverswyn et al., 1984) y en cultivos primarios de perro depende de los niveles de AMPc (Gerard et., al 1989).

La cinética de la respuesta transcripcional de la *Tg* por al AMPc es relativamente lenta, e involucra la síntesis proteica. La activación de la proteína quinasa A (PKA) no es suficiente para activar la transcripción del gen de *Tg*, mientras sí es suficiente para estimular la transcripción del gen de la peroxidasa tiroidea (Gerard et., al 1989; Dremier et al., 1997).

El incremento en la concentración de PAX8 estimulado por TSH/AMPc parece no ser suficiente para estimular la expresión de *Tg*. En consecuencia, se cree que NKX2-1, PAX8 y uno o más factores aún no identificados estarían regulando la expresión de la *Tg*.

#### Aspectos estructurales y funcionales de Pendrina (PDS)

PDS (**P**endred **S**ndrome) está localizada en la membrana apical de la célula folicular, es un transportador de iones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{I}^-$ , y posee 12 dominios transmembrana (Royaux et al., 2000). Está codificada por el gen PDS (Everett et al., 1997) que posee 780 aa y pertenece a la familia de transportadores de solutos 26-A la cual está relacionada al transporte de aniones (Everett & Green, 1999) tales como Cloruro y Ioduro (Scott & Karniski, 2000; Dossena et al., 2006; Cheng et al., 2007).

Pacientes con una alteración genética en el gen de *Pds*, han perdido la capacidad de transportar iones a través de pendrina y se caracterizan por la pérdida de audición además de una insuficiente organificación de yodo que se acompaña con un incremento en el tamaño de la glándula tiroides (bocio) (Pendred, 1986; Reardon & Trembath, 1996; Everett et al., 1997).

El mecanismo de regulación de la Pendrina es poco claro, debido a que en células FRTL-5 se ha determinado que no está modulada por la hormona insulina (Royaux et al., 2000) y que TSH podría modularla positivamente no de manera directa sino a través del incremento de los niveles de Tg (Zuzuki & Kohn, 2006). También se ha demostrado en células FRTL-5 al aplicar RNA de interferencia (RNAi) para *Nkx2-1* que *Pds* al igual que *Tg* es regulada positivamente por dicho factor de transcripción (Dentice et al., 2005).

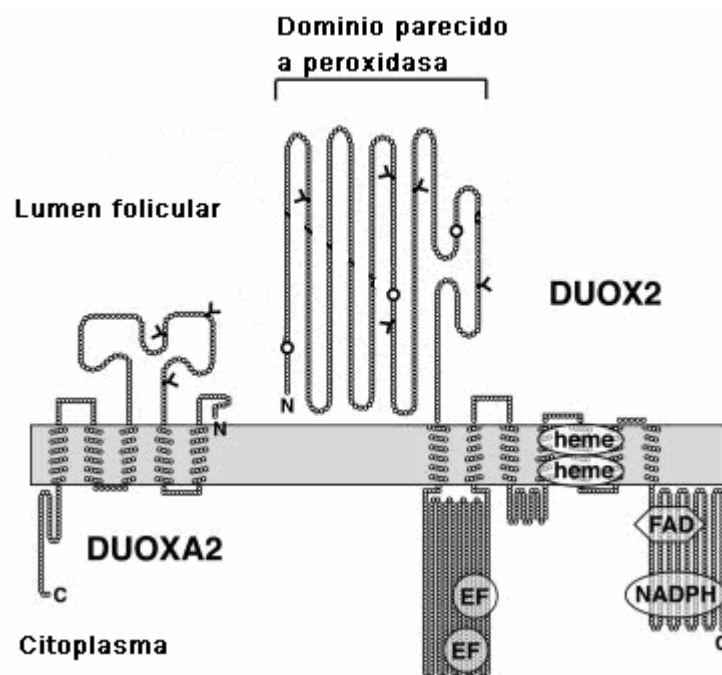
Por el contrario Muscella et al. (2008), han observado que la insulina y la TSH promueven un mayor eflujo de yoduro al promover la translocación de PDS, a través de la vía de PKC- $\alpha$ , desde el citosol a la membrana en células de rata PCCL3.

#### Aspectos estructurales y funcionales de DUOX1 y DUOX2

El  $H_2O_2$  es necesario para la biosíntesis de HT, es producida por un sistema enzimático de NADPH oxidasas ubicadas en la membrana apical del tirocito. Éste, está conformado por dos enzimas denominadas dual oxidasa 1 (DUOX1 o THOX1) y dual oxidasa 2 (DUOX2 o THOX2) y utilizaría a los piridin nucleótidos reducidos

como dadores de hidrógeno. Para la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el tirocito, requiere de concentraciones micromolares de  $\text{Ca}^{2+}$  (Nakamura et al., 1987; Déme et al., 1994), de la asociación de DUOX1 con su factor de maduración DUOX1A1 y de DUOX2 con DUOX2A2 (Dupuy et al., 1999; De Deken et al. 2000; Grasberger & Retetoff, 2006).

Se han propuesto dos mecanismos para la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En ambas hipótesis la NADPH oxidasa produce  $\text{H}_2\text{O}_2$  en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , pero en una el  $\text{O}_2$  es reducido directamente por la NADPH oxidasa (Dupuy et al., 1991), mientras que en la otra la enzima NADPH oxidasa interacciona con NADPH,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{O}_2$  generando anión superóxido que luego a través de la superóxido dismutasa (SOD) es convertido en  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Nakamura et al., 1989; Dupuy et al., 1991).



**Figura 11:** representación esquemática de DUOX-2 y su factor de maduración DUOX2A-2. Adaptado de Grassberger et al., 2007

Los productos de los genes *Duox1* y *Duox2* tienen una longitud aproximada de 1517 aa, un peso molecular de 178 KDa y poseen un alto grado de similitud de aproximadamente 75 % (Dupuy et al., 2000). Poseen siete dominios de transmembrana, dos dominios tipo *EF-Hand* de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  y exponen hacia el lumen folicular su dominio N-terminal donde se encuentra el sitio de síntesis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 11) (El-Hassani et al. 2005).

Rigutto et al. (2009) han observado que las vías de activación para DUOX1 y DUOX2 son completamente distintas. DUOX1 es modulado positivamente en su activación si se incrementan los niveles de AMPc y a través de la vía de PKA donde se produce la fosforilación de los aa  $\text{Ser}^{955}$  y  $\text{Ser}^{1217}$ ; estos aa son conservados en especies diferentes como humano, rata, ratón, cerdos y perros. Mientras que  $\text{Ser}^{955}$  actuaría como un sitio de activación,  $\text{Ser}^{1217}$  sería un dominio de inhibición de la actividad de DUOX1. Con respecto a DUOX2, se ha demostrado que es activada a través de la vía de PKC y que posee 11 sitios posibles de fosforilación, de los cuales 6 no se encuentran en DUOX1. Por último, DUOX2 es mil veces más sensible al tratamiento con acetato de forbol miristato (PMA) lo que sugiere que en condiciones fisiológicas para los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  y de DAG solo DUOX2 tiene la capacidad de activarse y generar  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Estos datos son concordantes con los observados por Song et al. (2010-b) donde la activación de la vía  $\text{Gq}$  – fosfolipasa C-  $\text{Ca}^{2+}$  -PKC promueve una optimización de la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al favorecer la conformación del complejo DUOXA-DUOX-TPO mientras que por el contrario, la activación de la vía  $\text{Gs}$ -AMPc-PKA produce una disminución en la formación de dicho complejo. En igual sentido

se ha observado que en poblaciones humanas que sufren de hipotiroidismo congénito, una parte de los individuos poseen mutaciones puntuales de carácter recesivo para DUOX2 mas no para DUOX1 (Grasberger et al., 2007; Rivolta et al., 2007).

Es poco clara la regulación transcripcional de las DUOXs y sus factores de maduración. Se cree que el espacio intergénico de 70 bp entre *Duox1-Duoxa1* está modulado por el factor de transcripción SP1, mientras que el espacio intergénico para *Duox2-Duoxa2* es de 170 bp, posee una caja TATA y una secuencia Inr (Christophe Hobertus & Christophe, 2010)

#### Aspectos estructurales y funcionales de NKX2-1

El producto del gen *Nkx2-1* es un factor de transcripción de 38 KDa, perteneciente a una familia que poseen un dominio de unión al DNA llamado homodominio o gen homeobox. Este dominio está formado por 61 aa y se ha observado que está altamente conservado entre distintas especies. La proteína NKX2-1 consiste en 3 regiones helicoidales (I, II y III), plegadas de forma globular. La secuencia del gen es conservada a lo largo de diferentes especies, contiene 3 exones (Hamdan et al., 1998 Lonigro et al., 1996) y múltiples sitios de inicio de la transcripción, donde el primero de ellos no se traduce y se ha detectado *splicing* alternativo que genera heterogeneidad en el extremo 5' (Ogucchi & Kimura, 1998).

Además de expresarse en tiroides, se lo encuentra en la hipófisis, paratiroides, células no ciliadas del epitelio bronquial y las células alveolares de tipo II del pulmón (Damante et al., 2001). El papel que tiene NKX2-1 en hipófisis es aún desconocido, pero en el pulmón se sabe que regula la expresión de genes para proteínas surfactantes del pulmón (Bruno et al., 1995; Bohinski, 1994; Yan et al., 1995).

Se ha observado tanto *in vivo* como *in vitro* que la TSH tiene la capacidad de disminuir los niveles de proteína y RNAm de *Nkx2-1*, estos resultados son reproducidos mediante tratamientos con dibutilil AMPc, mas no por PMA (Saito et al., 1997).

En contraposición al efecto que produce la TSH sobre *Nkx2-1*, éste en la tiroides desempeña un importante papel por ser esencial para la transcripción de *Nis* (Taki, 2002), *Tg* (Shimura et al., 2001), *Pds* (Dentice et al., 2005) y para su propia autorregulación (Oguchi & Kimura, 1998).

Yamada et al. (2011) han propuesto que la región promotora de *Nkx2-1* se extiende más allá de -2,6 Kb en el extremo 5' desde el inicio de la transcripción. Algunos factores de transcripción que modulan a *Nkx2-1* dentro de la región de -2.6 kb han sido identificados como HNF-3, GATA6 y Oct 1 (Ikeda et al., 1996, Shaw – White et al., 1999; Toonen, 1996; Pan et al., 2004).

### Aspectos estructurales y funcionales de FOXE1

El producto del gen *Foxe1* es un factor de transcripción de 370 aa y un peso molecular de 42 kDa, posee un dominio de unión al DNA de 100 aa denominado *forkhead*. (Pierrou et al., 1994; Pani et al., 1992). Este gen no solo se expresa en tiroides, también lo hace en hipófisis durante el desarrollo embrionario y en regiones craneofaciales.

En ratones *knock-out* se observó que la falta de FOXE1 no afecta a la formación pero sí a la migración de la tiroides durante la embriogénesis, estos ratones presentan tanto ectopía como agenesia de tiroides y paladar hendido (De Felice et al., 1998). Por el contrario, la ausencia de NKX2-1 y PAX8 determina la no formación de la glándula. (Damante et al., 2001; Gehring et al., 1994). El hecho que los ratones presenten tiroides sublingual (ectópica) junto con otros estudios ha definido a la función de FOXE1 como responsable de la migración de la tiroides desde su posición sublingual a su posición definitiva en la tráquea (Dathan et al., 2002).

Cuesta et al. (2007) han propuesto que FOXE1 sea considerado como un factor de transcripción tipo “*pioneer*”, debido a su capacidad de unirse al DNA en regiones promotoras compuestas de cromatina compactada y permitir así eventos de apertura de la misma, tal como reportaron para *Tpo*.

*Foxe1* es modulado positivamente por TSH a nivel transcripcional y de actividad de unión al DNA, y es necesario para la correcta regulación de los genes *Nis*, *Tg* y *Tpo*. También se ha determinado que es el principal responsable de la



respuesta de *Tpo* a la TSH y al factor IGF-1 (Aza –Blanc et al., 1993). Su sobreexpresión promueve la formación de bocio nodular y retraso del crecimiento en ratones recién nacidos (Nikitski et al., 2016). Otra característica de *Foxe1* es que es reprimido por el óxido nítrico en células FRTL-5 y conlleva a una disminución de la expresión de *Tpo* (Montesinos et al., 2015).

### Aspectos estructurales y funcionales de PAX8

PAX8 es un factor de transcripción de 68 KDa y una longitud de 128 aa perteneciente a la familia *paired box* (Bopp et al. 1989). Esta familia en mamíferos está compuesta por 9 genes (Walther et al. 1991; Stapleton et al. 1993).

Se ha observado que PAX8 desempeña un rol central en la morfogénesis y mantenimiento diferenciado del fenotipo tiroideo (Plachov et al., 1990; Poleev et al., 1992; Pasca di Magliano et al., 2000).

TSH a través de la vía de AMPc tiene la capacidad de modular positivamente a *Pax8* a nivel transcripcional y de su actividad (Mascia et al., 2002). Sitios de interacción para PAX8, donde regula de manera positiva, han sido identificados en las regiones promotoras de genes tiroideos como *Nis*, *Tg*, *Tpo* y *Foxe1* (Ohno et al., 1999; Mascia et al., 2002; Aza-Blanc et al., 1993; Di Palma et al., 2011) además de existir evidencia de autorregulación (Di Gennaro et al., 2013).

Este *paired box* tiene la capacidad de interactuar a través de sus dominios terminales con distintas proteínas como CRE-L, P300, NKX2-1; SMAD3 y NFκB

(Taki et al., 2002; De Leo et al., 2000; Chun et al., 2004; Costamagna et al., 2004; Nicola et al., 2010).

Es poco claro el mecanismo de regulación transcripcional de *Pax8*, porque si bien está modulado positivamente por la vía del AMPc, se ha determinado que para su óptimo nivel de transcripción requiere de su región potenciadora que ha sido identificada a una distancia de 84,4 kb desde el extremo 5' UTR. Este potenciador es conservado en humanos, rata y ratón y posee seis sitios protegidos para DNAsa I, donde la secuencia de dos sitios son reconocidos por NKX2-1 (Nitsch et al. 2010).

## **Iodo como regulador de la función y crecimiento tiroideo**

El iodo desempeña un papel importante en la bioquímica y fisiología de la tiroides. Es indispensable para una adecuada biosíntesis hormonal debido a que es el único factor limitante de la misma en condiciones normales. El contenido de iodo intratiroideo es un factor regulador de la función y de la proliferación celular del tirocito (Dumont et al., 1992) puesto que además de representar el principal sustrato para la biosíntesis hormonal en la célula tiroidea, el yoduro posee la capacidad de regular directamente el crecimiento y función de la glándula tiroides en forma independiente de TSH. A este mecanismo se lo denomina autorregulación tiroidea.

La acción del iodo sobre el crecimiento de la glándula ha sido muy estudiada. Se ha podido determinar que ratas sometidas a una dieta pobre en iodo son muy sensibles a la acción de la TSH, y que esto conlleva a un aumento del crecimiento

glandular. Por tanto cuando el contenido intratiroideo de iodo se encuentra significativamente disminuido tiene lugar el desarrollo del bocio con niveles normales de TSH.

A pesar de la variabilidad en la ingesta, en poblaciones donde la cantidad de iodo es adecuada, la secreción de hormonas tiroideas y los niveles de TSH se mantienen constantes. Esta adecuación resulta de la capacidad de la tiroides de controlar su función y modular la respuesta a TSH dependiendo de las cantidades de yoduro disponibles. Un incremento significativo en el aporte de yoduro produce en primer término un aumento de la síntesis hormonal pero, posteriormente, un fenómeno denominado Wolff- Chaikoff conduce al bloqueo de la organificación como resultado del aumento de yoduro intracelular. El mecanismo de bloqueo de la organificación involucra una acción inhibitoria del yoduro sobre TPO y DUOXs (Kopp, 2005; Leoni et al., 2008), disminuyendo la secreción hormonal y el crecimiento tiroideo, de manera independiente de TSH (Dohan et al., 2003). Si la exposición al yoduro se prolonga se produce una recuperación de la formación de iodotironinas, fenómeno denominado escape del efecto Wolff-Chaikoff. Esta adaptación se debe en parte a una menor captación de yoduro por una disminución en la expresión de *Nis*, lo que reduce el yoduro intratiroideo a niveles insuficientes para ocasionar el efecto Wolff-Chaikoff. Este fenómeno forma parte de un mecanismo intrínseco altamente especializado que protege a la tiroides de altas dosis de yoduro (Dohan et al. 2003).

En altas dosis el yoduro tiene la capacidad de inhibir en tiroides la secreción hormonal (De Groot et al., 1956) y el flujo sanguíneo (Rognoni et al., 1984).

Se ha observado que tanto *in vivo* como *in vitro* el halógeno tiene la capacidad de inhibir la vía Gs-AMPC-PKA (Cochaux et al., 1987; Van Sande et al., 1975). También se ha reportado que tiene la capacidad de inhibir la síntesis de Tg (Pregliasco et al. 1996, Thomasz et al. 2010), TPO (Mori et al. 1998) y NIS (Grollman et al. 1986; Eng et al. 1999; Suzuki et al. 2010).

Respecto a la producción de  $H_2O_2$ , el iodo posee diferentes efectos dependiendo de la especie y de la concentración (Corvilain et al., 1994; Van Pannels et al., 1994; Corvilain et al., 2000; Morand et al., 2003). Es así que en humanos, perro y en cerdo tiene efecto inhibitorio (Corvilain, et al., 1994) mientras que existe una estimulación en ovejas (Corvilain et al. 2000). Sin embargo, existen contraposiciones en otras especies, donde se ha observado una disminución en la producción de  $H_2O_2$  en perro (Van Pannels et al., 1994) y en cerdo (Morand et al., 2003), mas no se corresponde a lo descrito por Corvilain et al., (2000).

Recientemente se ha sugerido la posibilidad de un mecanismo inhibitorio ejercido por yoduro capaz de ejercer una reducción de los niveles de RNAm de *Nis* mediante mecanismos postraduccionales (Serrano-Nascimento et al., 2010).

La mayoría de los efectos inhibitorios generados por el exceso de iodo son bloqueados si se incuba o se administra conjuntamente con drogas que bloquean la acción de la TPO, como MMI o PTU (Van Sande et al., 1975; Panneels et al., 2009). Esto demuestra que el iodo para ejercer su efecto sobre las funciones y crecimiento de la glándula tiroides necesita ser organificado (Figura 12) y ese iodocompuesto orgánico ha sido denominado elemento XI. Para tal identidad se han propuesto

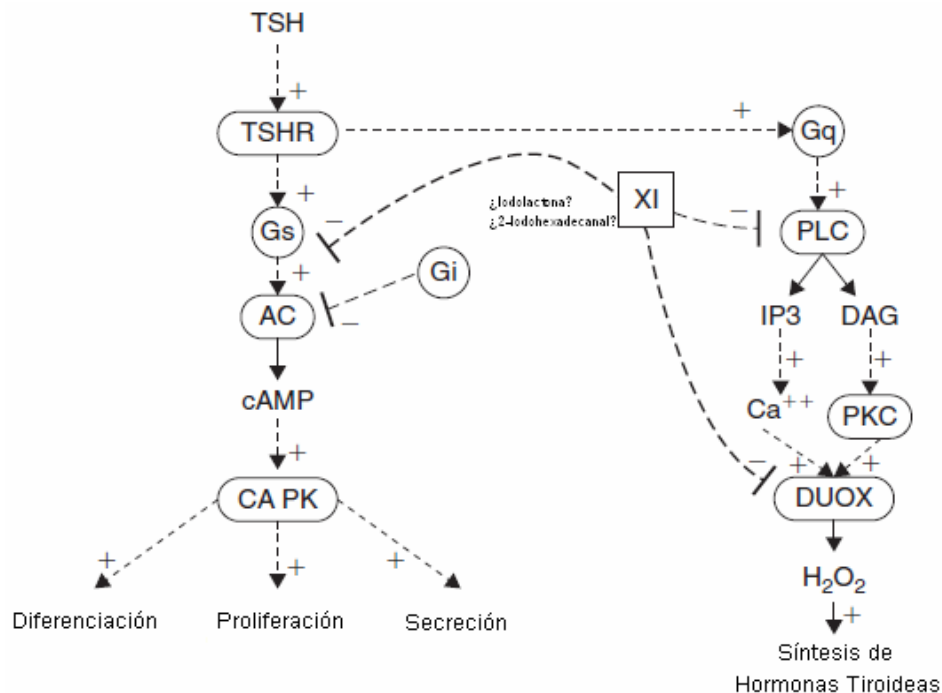
diferentes mediadores como péptidos iodinados (Lissitzky et al., 1961), la proteína Tg (Sellitti & Suzuki, 2014) o la hormona  $T_3$  (Juvenal et al., 1981).

Se ha demostrado la existencia de una segunda vía metabólica del iodo dentro de la tiroides, que conduce a la biosíntesis de lípidos iodados. Boeynaems & Hubbard (1980) han demostrado que la adición de yoduro y ácido araquidónico en lóbulos de tiroides de ratas da como resultado la formación de 6-iodo-11,14-eicosatrienoico -lactona, y Druguillon et al., 1990 lo demostraron en cortes de tiroides humanas. Otro iodolípido, el 2-iodo-hexadecanal, fue determinado como el de mayor biosíntesis cuando tiroides de caballo se incubaron con iodo radioactivo (Pereira et al., 1990). Sin embargo, todavía no está definitivamente identificado el rol o los compuestos intermediarios en la acción del iodo, de ahí la importancia de poder continuar con los estudios y poder identificar este compuesto.

### **6-iodo-11,14-eicosatrienoico -lactona (IL- )**

La IL- (Figura 13) ejerce efecto inhibitorio tanto sobre la proliferación celular como sobre la expresión de funciones diferenciadas, tales como la captación y organificación del iodo, la generación de  $H_2O_2$ , la captación de glucosa y aminoácidos; y la actividad de las enzimas ligadas al transporte a través de membrana.

La biosíntesis de la IL- utiliza como precursor el ácido araquidónico (Pisarev et al., 1985), a su vez dicha síntesis es incrementada con el agregado de dicho ácido en folículos porcinos, tiroides de rata y tejido humano (Boeynaems & Hubbard, 1980; Druguillon et al., 1994).



**Figura 12:** Representación esquemática de la posible acción del compuesto iodado que permitiría el efecto Wolff - Chaikoff. Adaptado de Panneels et al. 2009

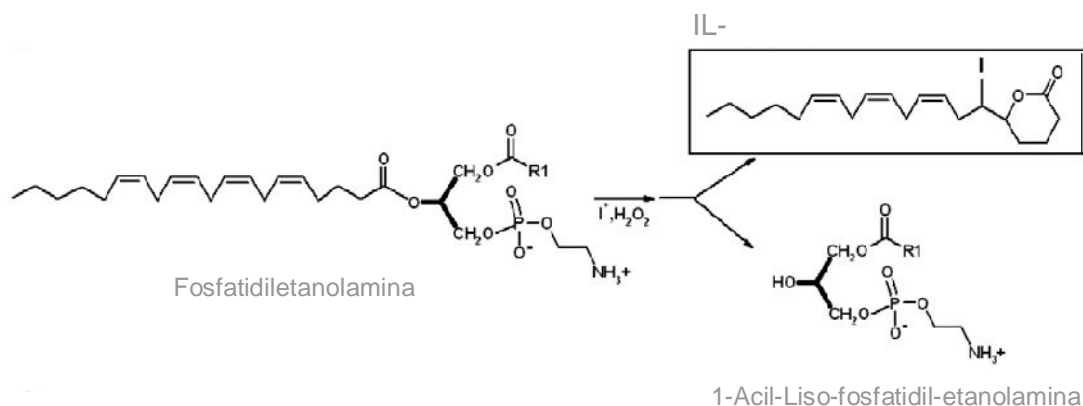
La aplicación de IL- sobre células FRTL-5 permitió observar una disminución en la proliferación celular bajo efectos de la TSH e inhibió la acción proliferativa de la forskolina (Pisarev et al., 1992). Esto permitió hipotetizar que la acción inhibitoria de la IL- podría estar relacionada con una disminución en los niveles de AMPc o en un paso vía abajo.

Por otra parte, en tirocitos de cerdo la IL- no posee efecto sobre el incremento de AMPc inducido por TSH, pero inhibe la acción proliferativa del EGF y la síntesis de fosfatidil inositol estimulado por EGF, (Dugrillon & Gartner, 1995). Se ha observado en cortes de tiroides bovinas que derivados iodados del ácido araquidónico, el 14-iodo-15-hidroxy-6-ácido eicosatrienoico (I-HO-A), su delta y

omega lactona (IL- y IL- ) mimetizan los efectos inhibitorios del iodo como la inhibición de la captación (Chazenbalk et al., 1988) y organificación del iodo (Chazenbalk et al., 1984). A nivel de la membrana celular Krawiec et al., (1991), han demostrado que el I-HO-A y su omega lactona (IL- ) reproducen los efectos inhibitorios del iodo sobre la captación de desoxiglucosa y la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa.

En ratas, la IL- inhibe la generación del bocio preformado inducido por MMI y también cuando se administra simultáneamente con el bociógeno (Pisarev et al., 1988 – 1994; Thomasz et al., 2010a).

Otra característica de la IL- es que en los bocios de ratas preformados tiene la capacidad de aumentar la apoptosis celular (Thomasz et al., 2010a), mas no reproduce todos los efectos del exceso de iodo en lo que respecta a los efectos a nivel de la transcripción a nivel de genes específicos tiroideos (Thomasz et al., 2010 b). Así mismo, la IL- ha demostrado efecto antitumoral en células de cáncer de colon HT-29 (Thomasz et. al., 2013)



**Figura 13:** representación esquemática de la posible biosíntesis de la iodolactona. Adaptado de Panneels et al. (2009)

La síntesis de este iodolípido no es restringido a la tiroides, Nuñez-Anita et al. (2009) han publicado que en células humanas de cáncer de mama MCF-7 la administración de  $I_2$  promueve la síntesis de lípidos iodados, mayoritariamente IL-. Éste posee efectos de inhibición de la proliferación y aumento de apoptosis a través de la vía de los Receptores Activados por Proliferación de Peroxisomas (PPARs). En igual sentido, la activación del subtipo gamma de los PPAR por parte de la IL- es crucial en el efecto antitumoral en cáncer de mama (Nava-Villalba et al., 2015)

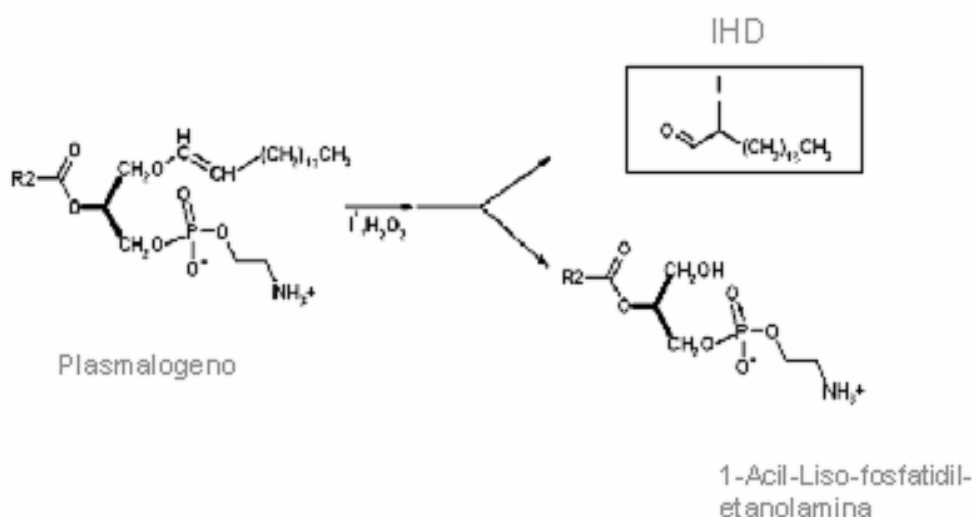
## 2-iodo-hexadecanal (2-IHDA)

El 2-IHDA ha sido aislado, purificado e identificado como el mayor de los iodolípidos en especies tales como perro (Rabinowitz et al., 1976), caballo y rata (Pereira et al., 1990) (Figura 14).



Se ha observado que este iodolípido posee la capacidad de disminuir los niveles de  $H_2O_2$  y la acumulación de AMPc inhibiendo directamente la actividad de la adenilato ciclasa tanto en cultivos de tiroides caninas como en cortes histológicos de tiroides humanas (Panneels et al., 2009; Paneels et al., 1996). En membranas de tiroides porcinas el 2-IHDA inhibe a la NADPH oxidasa (hoy conocidas como DUOX1 y DUOX2, Ohayon et al., 1994) y disminuye la acumulación de AMPc inhibiendo directamente la actividad de la adenilato ciclasa (Panneels et al., 1994).

El 2-IHDA reproduce los efectos del exceso de yodo sobre la producción de AMPc y de  $H_2O_2$  en tiroides de caballo, conejo y perro (Pereira et al., 1990; Ohayon R., 1994; Panneels, 1994). En igual sentido sería el mediador de dos importantes mecanismos regulatorios en la glándula tiroides: el efecto Wolff-Chaikoff y la inhibición de la adenilato ciclasa.



**Figura 14:** representación esquemática de la biosíntesis del 2-IHDA; Adaptado de Panneels et al (2009).

Thomasz et al. (2010 a) han publicado que el 2-IHDA posee la capacidad de inhibir el crecimiento del bocio en ratas tratadas con MMI, además de inhibir el incremento de los niveles de AMPc sin modificar los niveles de TSH. También se observó que durante la involución del bocio, el 2-IHDA promueve una recuperación más rápida del peso tiroideo.

En células FRTL-5, este iodolípido posee efectos antiproliferativos promoviendo el arresto en fase G1 (Thomasz et al., 2015). En igual sentido Salvarredi et al., (2015) han publicado que parte de la inhibición generada por el 2-IHDA se realiza a través de la modulación de los micro RNA let-7f y mir 138. Al mismo tiempo observaron una regulación diferencial sobre genes tiroideos como *Tpo*, *Tg*, *Nkx2-1* y *Foxe1*.

En consecuencia estos estudios han avalado la existencia de un mecanismo autorregulatorio tiroideo mediado por la síntesis de iodolípidos (Panneels et al., 2009; Pisarev et al., 2000). La IL- no reproduce todos los efectos del yoduro (Thomasz et al., 2010 b) y por tanto es de real interés y relevancia estudiar el **rol del 2-IHDA en el mecanismo de autorregulación de la glándula tiroidea.**

### **Receptores Proliferativos Activados por Peroxisomas (PPARs)**

Los PPARs son miembros de la superfamilia de receptores nucleares (NR) y existen tres subtipos: alfa (a); beta (b) y gamma (g). Estos NR deben heterodimerizar con el receptor de ácido retinoico (RXR) para poder interaccionar

con el DNA (Gearing et al., 1993; Elstner et al., 1998). Los PPARs son receptores nucleares de hormonas esteroideas (Mangelsdorf et al., 1995; Wahli & Martinez 1991). Los tres subtipos poseen tres grandes dominios proteicos. En el extremo amino-terminal poseen un dominio A/B que posee sitios de activación por fosforilación a través de proteínas quinasas activadas por mitosis –MAPK (Juge-Aubry et al., 1999; Hu et al., 1996; Katherine & Burns, 2007). Luego poseen un dominio C de unión al DNA y que se parece a un doble dedo de zinc (Schwabe et al., 1990) y el tercer dominio E/F es de activación por interacción con un ligando (Dreyer et al., 1992; Issemann & Green 1990; Gottlicher et al., 1992). La mayor diferencia entre los tres subtipos es observada en el dominio de interacción del ligando (Hihi et al., 2009) donde PPAR beta y gamma poseen una homología de 70% y 68% respecto de alfa, respectivamente (Figura 15).

<b>hPPAR<math>\alpha</math></b>	<b>A/B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E/F</b>
<b>hPPAR<math>\beta/\delta</math></b>		<b>86%</b>		<b>70%</b>
<b>hPPAR<math>\gamma</math></b>		<b>83%</b>		<b>68%</b>

**Figura 15:** Representación de los dominios de los tres subtipos de PPAR en humanos y su homología respecto de PPAR alfa. Adaptado de Hihi et al., (2002).

El PPAR alfa (PPAR $\alpha$ ) está mayormente asociado a la modulación de genes intervinientes en la proliferación celular (Miller et al., 1996; Pighetti et al., 2001; Panigrahy et al., 2008) y su interacción con agonistas exógenos pertenecientes a la

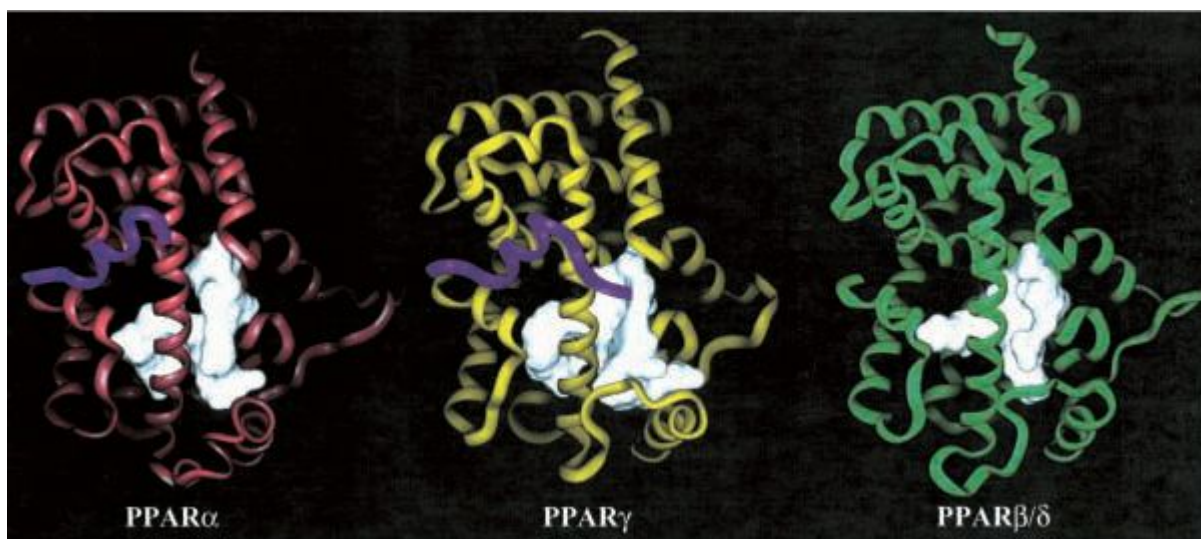
familia de los fibratos promueve un aumento en la beta-oxidación de ácidos grasos (Wahli et al., 1995; Leone et al., 1999). Respecto a los ácidos grasos PPARα posee la capacidad de regular a nivel transcripcional la producción de la enzima Acil-coenzima A oxidasa clave en la vía de la beta-oxidación (Dreyer et al., 1992); también modula la enzima carnitina palmitoil transferasa I y su actividad en los peroxisomas (Mascaro et al., 1998).

El PPAR beta posee efectos ubicuos y su función es desconocida en la mayoría de los tejidos que ha sido descrito, pero tiene la capacidad de incrementar la proliferación en líneas celulares sensibles a hormonas sexuales como estrógenos y testosterona (Stephen et al., 2004; Yin et al., 2005).

PPAR gamma (PPARγ) es mayormente expresado en tejido adiposo y promueve su diferenciación celular (Mueller et al., 1998). Además en su interacción con agonistas exógenos de la familia de las tiazolidinadionas desempeña un papel anti-tumoral en distintas líneas celulares de cáncer (Yin et al., 2005; Elstner et al. 1998; Yin et al., 2001; Lapillone et al., 2003). Respecto a la tiroides se ha observado que cuando PPARγ posee su función disminuida esto promueve un aumento de la proliferación (Park et al., 2005; kato et al., 2006; Espadinha et al., 2007; Placzkowski et al., 2008; Tepmongkol et al., 2008; Antonelli et al., 2013) y una disminución de la diferenciación celular (Frohlich et al., 2005; Au et al., 2006; Espadinha et al., 2009).

Se han identificado distintos ligandos endógenos para los PPARs. PPAR alfa puede interaccionar con ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido

linoleico, ácido araquidónico y eicosapentanoico. PPAR gamma interacciona con ácido linoleico, ácido araquidónico y prostaglandinas (Kota et al. 2004).



**Figura 16:** Representación tridimensional de los tres subtipos de PPARs y la identificación de sus sitios activos. Adaptado de Hihi et al., (2002).

Se ha reportado que la  $\gamma$ -iolactona actúa uniéndose a estos receptores para promover la inhibición de la proliferación en células de cáncer de mamás (Nuñez-Anita et al., 2009) y por lo tanto es de real interés y relevancia estudiar el **rol de estos receptores en el mecanismo de acción del 2-IHDA**.

## **Objetivos**

Los antecedentes existentes demuestran que el exceso de iodo tiene capacidad de inhibir parámetros tiroideos con respecto a la función y crecimiento de la glándula. Además se sabe que el halógeno no solo es utilizado por la tiroides para producir HTs sino también lípidos iodados y que aquel debe estar organificado para promover la acción del efecto Wolff-Chaikoff.

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio han permitido observar la capacidad de los iodolípidos de modificar la funcionalidad y crecimiento de la célula folicular tiroidea induciendo cambios en el fenotipo y en el patrón de expresión génica (Thomasz et al., 2010 a y b; Thomasz et al., 2015; Salvarredi et al., 2015).

En base a los antecedentes presentados, el objetivo general de este trabajo de tesis ha sido analizar el rol del 2-IHDA en el mecanismo de autorregulación tiroidea estudiando su acción sobre la modulación de parámetros relacionados a la función y diferenciación de la célula folicular tiroidea normal así como los posibles mecanismos involucrados en esta regulación.

### **Objetivos específicos:**

- Analizar la acción del KI y el 2-IHDA sobre la proliferación celular tiroidea.
- Analizar la posible acción del KI y el 2-IHDA sobre la regulación de la función tiroidea mediante el estudio de parámetros tales como: captación, organificación, eflujo de  $^{125}\text{I}$  y niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

- Estudiar la acción del 2-IHDA en la modulación de los genes de interés (*Nis*, *Pds*, *Duox1*, *Duox2*, *Tpo*, *Tg*, *Nkx2-1*, *Foxe1* y *Pax8*) a nivel de la transcripción y traducción.
- Estudiar la posible acción del 2-IHDA a nivel de transcripción y actividad proteica sobre la familia de receptores nucleares PPAR.
- Estudiar la acción del 2-IHDA sobre los patrones de acetilación de histonas H3 en las regiones promotoras de los genes *Nis*, *Tg* y *Tpo*.

## **Materiales y Métodos**

### **A) Síntesis del 2-IHDA**

#### **1) Síntesis de n-hexadecanal**

Se disolvió 4 g de n-hexadecanol en 30 ml de dicloro metano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) y se le agrego 5,33 g de clorocromato de piridina (PCC -  $\text{C}_5\text{H}_6\text{ClCrNO}_3$ ). La reacción tuvo lugar bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  a temperatura ambiente durante 1,5 h. El producto de la reacción obtenido en el sobrenadante fue filtrado por medio de la acción de vacío a través de papel de filtro tipo *Whatman*. El precipitado de la reacción, de color negro, fue lavado tres veces con 10 ml de dimetil eter anhidro. Los sobrenadantes también fueron filtrados y se juntaron las colectas. El total del volumen fue reducido en atmósfera de nitrógeno. El producto luego fue diluido en 3 ml de una mezcla de hexano/dietileter en proporción 8:2; y posteriormente fue eluido a través de una columna de florisil. La solución obtenida fue evaporada bajo corriente de  $\text{N}_2$  obteniéndose el n-hexadecanal.

#### **2) Síntesis de 2-IHDA**

0,250 g de hexadecanal fueron disueltos en 3 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , luego se le añadió 0,141 g de  $\text{HgCl}_2$  y 0,264 g de iodo elemental ( $\text{I}_2$ ). Durante dos horas tuvo lugar la reacción en ausencia total de luz y con agitación vigorosa a temperatura ambiente. La solución obtenida fue filtrada a través de papel *Whatman* y clarificada mediante la adición de tiosulfato de sodio. El total de la



mezcla fue trasvasada a una ampolla de decantación con H<sub>2</sub>O bidestilada y se extrajo 5 veces con 20 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las fases orgánicas fueron reunidas y se lavó una vez más con agua bidestilada. La fase orgánica obtenida fue evaporada hasta obtener un producto color blanco bajo corriente de N<sub>2</sub> y en completa ausencia de luz. El producto fue disuelto en 2 ml de la mezcla de hexano/dietileter (8:2) y se eluyó en columna de sílica gel. Se tomaron muestras cada 1 ml a lo largo de 25 ml para lograr separar el hexadecanal del 2-IHDA. Las muestras obtenidas fueron analizadas por cromatografía de capa delgada (TLC) utilizando como fase móvil la mezcla hexano/dietileter (8:2). Una vez identificadas las alícuotas que contenían solo el 2-IHDA, las mismas fueron colectadas y evaporadas en atmósfera de nitrógeno hasta obtener un producto blanco.

## **B) Efectos del 2-IHDA sobre la proliferación de la célula tiroidea.**

### **1) Estudio de la viabilidad celular por exclusión con azul de tripán**

Las células *Fisher Rat Thyroid Line* -5 (FRTL-5) fueron cultivadas en placas de 24 pocillos (15000 células por pocillo) en medio 6H (DMEM, antibióticos, somatostatina 10 ng/ml, hidrocortisona 0,4 ng/ml, transferrina 5 µg/ml, glycil-L-histidil-L-lisina 10 ng/ml, insulina 10 µg/ml y TSH 0,5 mU/ml) con 5% de suero fetal bovino (SFB) durante dos días y mantenidas en estufa de cultivo a 37 °C en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Se retiró el medio y se cultivó 72 h con medio 5H (sin TSH).

Luego se realizaron los distintos tratamientos:

- Medio 5H (CONTROL)
- Medio 6H (T)
- T + 2-IHDA 30  $\mu$ M (T + 2-IHDA 30)
- T + 2-IHDA 10  $\mu$ M (T + 2-IHDA 10)
- T + 2-IHDA 5  $\mu$ M (T + 2-IHDA 5)
- T + KI 30  $\mu$ M (T + KI 30)
- T + KI 10  $\mu$ M (T + KI 10)
- T + KI 5  $\mu$ M (T + KI 5)

El número de células se calculó utilizando una cámara de Neubauer luego de 24, 48 y 72h de tratamiento. Para ello, a las células se les retiró el medio de cultivo y fueron despegadas de la placa mediante la utilización de 0,2 ml de tripsina que luego fue bloqueada con 0,2 ml de SFB. Posteriormente las células fueron teñidas con azul tripan y se contaron al microscopio. Se determinó el número total de células vivas de la siguiente manera: se mezclaron 10  $\mu$ l de la suspensión (células, tripsina y SFB) con 10  $\mu$ l del colorante antes mencionado, se homogeneizó y se sembró 10  $\mu$ l en la cámara de Neubauer. Luego se contaron al microscopio y se calculó el número de células por la formula:

$$(\# \text{ células en toda la cámara} / \# \text{ cuadrantes}) \times 2 \times 1 \times 10^4 = \# \text{ células/ml}$$

Donde:        2 es el factor de dilución de la suspensión en el colorante  
                   $1 \times 10^4$  factor de corrección para expresar en mililitros.

## 2) Estudio de la viabilidad celular por 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromuro (MTT)

Se realizó el ensayo de proliferación celular con MTT. De acuerdo a lo descrito por Mosmann (1983) y Denizot et al., (1986). El mismo se basa en la reducción metabólica del MTT por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa y la obtención de un compuesto coloreado de color azul denominado formazan. Esto, permite estudiar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas y correlacionar su actividad con la supervivencia y proliferación celular a los tratamientos aplicados.

Aproximadamente tres mil células fueron sembradas por pocillo de placa P96 y cultivadas tal como se describe en B.1; luego, sin cambiar el medio, se agregó a cada pocillo 30 µl de una solución de MTT (5 mg/ml en buffer fosfato) y se incubó 4 h a 37°C en estufa. Se eliminó el medio de incubación y se agregó 200 µl de dimetil sulfoxido (DMSO) a cada pocillo. Posteriormente se procedió a medir la absorbancia a 540 nm en un lector de placas (DTX 880, Beckman Coulter).

### **C) Efectos de los Iodolípidos sobre la función de la célula tiroidea.**

#### 1) Estudio de la captación de $^{125}\text{I}$

Células FRTL-5 fueron cultivadas en placas tipo P24 tal como se describió en B.1. Luego se aplicó 1 µCi / pocillo de  $^{125}\text{I}$  (New England Nuclear, USA) y se incubó en estufa a 37 °C durante 45 min. Posteriormente las células

fueron lavadas tres veces con buffer fosfato salino 1x (PBS – NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; NaHPO<sub>4</sub> 10mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM ) más KI 1μM; luego se le aplicó 0,5 ml de NaOH 0,3 M durante 48 h. Paso siguiente se tomó 0,1 ml de cada pocillo y se procedió a medir la radioactividad. Los resultados fueron normalizados midiendo la cantidad de proteína contenida en cada pocillo por el método de Lowry et al., (1951). Los resultados se expresan como cuentas por minuto (CPM) / μg de proteína.

## 2) Estudio del eflujo de <sup>125</sup>I

Células FRTL-5 fueron cultivadas, en placas tipo P24 tal como se describió en B.1. Luego se aplicó 1 μCi / pocillo de <sup>125</sup>I (New England Nuclear, USA) y se incubó en estufa a 37 °C durante 45 min. y rápidamente se lavaron tres veces con buffer PBS 1X frío más KI 1μM, se agregó y retiró medio 5H + KI 1μM + KClO<sub>4</sub> 1 mM en una frecuencia cada 2 minutos durante 14 minutos. Los sobrenadantes luego fueron analizados en contador gamma para determinar la cantidad de <sup>125</sup>I eluído. El remanente de <sup>125</sup>I contenido dentro de las células fue analizado luego de aplicar 0,5 ml de NaOH 0,3 M durante 48 h y se procedió a medir la radioactividad (CPM). Los resultados fueron normalizados midiendo la cantidad de proteína contenida en cada pocillo por el método de *Lowry*. Los resultados son expresados como CPM retenidas en las células / μg de proteína.

### 3) Estudio de la captación de desoxiglucosa -<sup>3</sup>H (DOG- <sup>3</sup>H)

Células FRTL-5 fueron cultivadas, en placas tipo P24, tal como se describió en B.1. Luego se lavó 3 veces con buffer KRB (Krebs – Ringer-Hepes; KCl 770 mM, MgSO<sub>4</sub> 775 mM, NaCl 770 mM, HEPES 200 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 155 mM, CaCl<sub>2</sub> 37,8 mM) 1x y se aplicó 200 µl de KRB mas 0,5 µCi / pocillo de desoxiglucosa - <sup>3</sup>H (30,2 Ci/mmol New England Nuclear, USA) se incubó en estufa a 37 °C durante 20 min. y rápidamente se lavó 3 veces con buffer KRB 1x. Por último a las células se le aplicó 0,5 ml de NaOH 0,3 M durante 48 h y se procedió a medir la radioactividad en contador de centelleo líquido con utilización de la solución Optiphase Hisafe 3 (Perkin Elmer , Boston, USA) . Los resultados fueron normalizados midiendo la cantidad de proteína contenida en cada pocillo por el método de *Lowry*. Los resultados son expresados como CPM / µg de proteína.

### 4) Estudio de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelular

Células FRTL-5 fueron cultivadas, en placas P24, tal como se describió en B.1. Luego las células fueron lavadas tres veces con PBS 1x y para medir la acción de los distintos tratamientos sobre la producción y liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al medio extracelular se utilizó y procedió a aplicar el protocolo correspondiente para el kit Amplex Red Hydrogen Peroxide/ Peroxidase Assay (Invitrogen, USA). Luego de 24 h de aplicados los tratamientos las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1x frío y sobre las mismas se aplicó 200 µl de la mezcla de reacción (100 µM Amplex Red más 0,2 U/ml peroxidasa de rábano picante en

*buffer* fosfato salino, pH 7,4; luego se incubó durante 45 min a 37°C y se extrajo el sobrenadante que se procedió a leer a 595 nm de emisión y excitación de 485 nm utilizando para ello un equipo lector de multiplacas DTX 880- Beckman Coulter. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias de fluorescencia normalizadas por el contenido de proteína.

#### 5) Estudio de los niveles intracelulares de $\text{Ca}^{+2}$ libre

Células FRTL-5 fueron cultivadas en placas tipo P24 tal como se describió en B.1. Luego se las lavó 3 veces con PBS 1x y se aplicó el protocolo correspondiente al kit FURA 2 AM (Invitrogen, USA). Para ello se aplicó sobre las células la sonda reconstituida en el buffer provisto por el kit y se incubó a 4 °C durante 30 minutos. Posteriormente las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1x frío y la fluorescencia fue medida a 340 nm excitación y 525 nm de emisión usando el equipo lector de multiplacas DTX 880 Beckman Coulter. La lectura de la fluorescencia se desarrolló en un lector de multiplacas tipo DTX 880 (Beckman Coulter , Alemania). Se retiró la solución con la sonda, se lavó 3 veces con PBS y posteriormente se le aplicó 0,2 ml de NaOH 0,3 M durante 48 h. Luego se tomaron 0,1 ml de cada pocillo y se procedió a medir la concentración de proteínas por el método de *Lowry*. Los resultados se expresan como OD relativas /  $\mu\text{g}$  de proteína.

#### 6) Estudio de las proteínas tiroideas

Células FRTL-5 fueron cultivadas, en placas tipo p60, tal como se describió en B.1. Luego las células fueron lavadas tres veces con PBS 1x frío,

tripsinizadas y levantadas. Las células disueltas en PBS 1x frío fueron centrifugadas a 800g durante 10 min. El sobrenadante se descartó y el *pellet* obtenido luego fue lisado en 50 µl de *buffer* RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1% Nonidet 40; 0,1% SDS; 0,5% desoxicolato) más la adición de inhibidores de proteasas (0,5 mM PMSF; 2,5 mM benzamidina; 10 µg/ µl aprotinina; 1 µg/ ml pepstatina), durante una hora en hielo. A continuación la solución fue aspirada unas 10 veces a través de una jeringa para obtener un mayor lisado de células. El homogenato total fue centrifugado a 10.000g durante 10 min. El *pellet* obtenido fue descartado y el sobrenadante se lo utilizó para determinar la concentración proteica. El extracto proteico (60 µg) se sembró con *buffer* de carga 2x (glicerol 2ml, b-mercapto etanol 14 M 0,8 ml; Tris-HCl 0,5 M-pH 6,8 2ml; SDS 10% 3,2 ml y una punta de espátula de azul de bromo fenol). Posteriormente, las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7,5% para proteínas con un tamaño superior a 120 KDa, 10 % para proteínas de entre 120 – 40 KDa y de 12,5 % para proteínas de menor tamaño en presencia de buffer de corrida (0,25 M Tris Base; 1,92 M glicina y 1% SDS). Las electroforesis se llevaron a cabo durante aproximadamente una hora a un amperaje constante de 15 mA con el sistema mini-protean de Biorad.

Luego de separadas, las proteínas fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa (Western Clear Signal, Merck , USA). Esto se realizó utilizando *buffer* de transferencia (0,25 M Tris Base; 1,92 M glicina; 1% SDS y 20%

metanol) durante 45 min. a 20 V en el sistema *Trans-Blot Sd Semi-Dry Transfer Cell* (BioRad, USA).

Finalizada la transferencia, las membranas fueron lavadas con buffer TBS-T (10 mM Tris pH8; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20) y se las bloqueó durante una hora con una solución de TBS-T + 5% de agente bloqueante (Amersham). Posteriormente, las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-T durante 10 min.

Se desarrolló luego un *immunoblotting* utilizando los anticuerpos que se describen en la tabla 2 disueltos en TBS con 0,2 % tween 20 y 5 % de albúmina de suero bovino (BSA) en la concentración allí descripta (vol/vol). Posteriormente las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-T durante 15 min.

La detección inmunoquímica se desarrolló usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina G (IgG) de conejo, ratón o cabra conjugado con peroxidasa, diluido en agente bloqueante Amersham al 5% en dilución 1:5.000 vol/vol durante una hora (Tabla 3). Posteriormente, las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-T durante 15 min.

Las proteínas específicas fueron visualizadas usando el método del potenciador de quimioluminiscencia PQL (Amersham Pharmacia Biotech, USA), para lo cual las membranas fueron puestas en contacto primero con el PQL durante 3 min. y luego puestas en contacto con placas radiográficas de Hyperfilm ECL durante unos minutos. Estas últimas fueron reveladas en cuarto



oscuro aplicándose líquido revelador, líquido de lavado y líquido fijador. Los resultados obtenidos fueron normalizados por la expresión de Actina. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de densidad óptica, referidas en unidades porcentuales respecto al control.

Proteína	Especie	Proveedor	Catálogo	Isotipo	Dilución
Tg	H/R/M	Dako	A0251	Conejo	1:300
NIS	H/R/M	Santa Cruz	Sc-134515	Conejo	1:300
TPO	H/R/M	Santa Cruz	Sc-58432	Ratón	1:300
DUOX	H/R/M	Santa Cruz	Sc- 49939	Cabra	1:200
PAX8	H/R/M	Santa Cruz	Sc-377181	Ratón	1:150
NKX2-1	H/R/M	Santa Cruz	Sc-13040	Conejo	1:150
FOXE1	H/R/M	Santa Cruz	Sc-16391	Cabra	1:150
ACTINA	H/R/M	Santa Cruz	Sc-1616	conejo	1:500

**Tabla 2:** Anticuerpos primarios utilizados para la inmunodetección de proteínas. Se indica para cada proteína la especie (H= humano; R= rata; M= ratón) que reconoce el anticuerpo y su isotipo. Se indica además el proveedor de cada anticuerpo y la dilución hace referencia a la concentración final utilizada (vol/vol).

Proteína	Proveedor	Catálogo	Isotipo	Dilución
Anti IgG Ratón HRP	Santa Cruz	Sc-2005	Cabra	1:5.000
Anti IgG Conejo HRP	Calbiochem	401315	Cabra	1:5.000
Anti IgG Cabra HRP	Santa Cruz	Sc-2020	Burro	1:5.000

**Tabla 3:** Se indica para cada anticuerpo secundario la inmunoglobulina G que reconoce (IgG) e isotipo como así también proveedor y código de catálogo. La dilución hace referencia a la concentración final utilizada (vol/vol) en los ensayos de Western blot.

## 7) Estudio de los RNAm

Células FRTL-5 fueron cultivadas, en placas tipo p100, tal como se describió en B-1.1. Luego las células fueron lavadas dos veces con PBS 1x frío y se aplicó *TRIZOL Reagent* (Invitrogen, USA) directamente sobre las células. Se aplicó luego el protocolo correspondiente a dicho reactivo, llevándose a cabo la dilución final en agua libre de RNAasa y DNAasa para biología molecular (Biodynamics, Argentina)

### 7.1 Transcripción Reversa de Reacción en Cadena de Polimerasa (RT-PCR)

La transcripción reversa se desarrolló según protocolo de “Superscript III – Invitrogen” con 5 µg de RNA total utilizando “Oligo dT<sub>15-18</sub>– Biodynamics” y “dNTP Mix- Promega”.

## 7.2 PCR convencional

Se desarrolló la PCR para cada uno de los genes tiroideos de interés (*Gadph*, *Nis*, *Pds*, *Tpo*, *Tg*, *Duox1*, *Duox2*, *Nkx2-1*, *Foxe 1*, *Pax8*) utilizando “PCR Master Mix – Promega” y fue aplicado el protocolo correspondiente utilizando una concentración de 100 pM de cada cebador (Tabla 4). Para comprobar que los productos de las PCR fueran los correctos, se procedió a realizar electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se observó el tamaño del amplicon con respecto a un marcador de DNA de 100bp “CienMarker – Biodynamics”.

Nombre cebador	Secuencia 5' -> 3'	Temp de anillado (TA)
NIS sentido	GCTGTGGCATTGTCATGTTC	57° C
NIS anti-sentido	TGAGGTCTTCCACAGTCACA	
Tg sentido	GAATTGCTGGCAGATGTTCAG	58° C
Tg anti-sentido	GGGCACTGAGCTCCTTGTAG	
TPO sentido	TCTGGCATCACTGAACTTGC	61° C
TPO anti-sentido	CGGTGTTGTCACAGATGACC	
Duox -1 sentido	GGCCATCAGTATGTCTTCG	61° C
Duox -1 anti-sentido	CGCTGATCTCCACCTTCTTC	
Duox -2 sentido	CAAATCGTCCATGGGTGCC	54° C
Duox -2 anti-sentido	TCCACAGTTGTCAGAAATAG	
Pendrina sentido	AGATGGAGCAGTGTGGGTTC	60° C
Pendrina anti-sentido	TGCTTCCATCAGTTCAAGAGG	
Nkx2-1 sentido	GGTGCCCTCTGGCCCTATAG	57° C
Nkx2-1 anti-sentido	GCTTGTGCGATGATGCCTTTT	

FOXE 1 sentido	TTCGTGTCTGCCATGTGAGC	61° C
FOXE 1 anti-sentido	GCCCACGTCCAAAGCAAATC	
Pax-8 sentido	GGCCACCAAATCTCTGAGCC	61 ° C
Pax-8 anti-sentido	TGGGAATCGATGCTCAGTCG	
GADPH sentido	ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	57° C
GADPH anti-sentido	TTTGAGGGTGCAGCGAACTT	

**Tabla 4:** cebadores utilizados para la realización de PCR convencional y PCR en tiempo real.

### 7.3 PCR en tiempo real

Se desarrolló PCR para cada uno de los genes de interés anteriormente descritos. Se utilizó “Mezcla Real 2X – Biodynamics” y se aplicó el protocolo correspondiente utilizando una concentración de 75 pM de cada cebador.

Las condiciones de PCR en tiempo real fueron:

Desnaturalización inicial	95° C → 5 min	} 40 ciclos
Desnaturalización	95° C → 20 seg	
Anillado	TA° C → 35 seg	
Elongación	72° C → 30 seg	
Desactivación de la enzima	72° C → 10 min	

También se analizó la disociación de segmentos en función de la temperatura (*melting*) para comprobar que los resultados obtenidos correspondieran a un único segmento. Además, para probar que los

productos de las PCR fueron los correctos, se procedió a realizar electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se observó el tamaño del amplicon con respecto a un marcador de DNA de 100bp “CienMarker – Biodynamics”.

Los resultados obtenidos se expresan como magnitudes de cambio respecto de la muestra control, además fueron analizados y cuantificados utilizando la técnica  $2^{-Ct}$  (Livak & Schmittgen 2001). Los ensayos se consideraron conformes cuando la eficiencia fue  $> 0,95$  y  $< 1,05$  y  $R^2 > 0,96$ .

## 8) Estudio de las regiones promotoras de los genes tiroideos

### 8.1 Generación de Bacterias Competentes

La mayoría de los plásmidos fueron obtenidos de donaciones de sus distintos autores, tal como se detalla en la tabla 5. La amplificación de las construcciones conllevó a la generación de bacterias competentes *Escherichia coli* cepa DH-5 .

Para su obtención, una colonia de bacterias fue cultivada a 37 °C de un día a otro en 1 ml medio LB (extracto de levadura 5 g/l, triptona 10g/l, NaCl 10g/l) con rotación continua de 250 rpm. Luego, se procedió a realizar una dilución 1:100 en medio LB y se tomaron lecturas de absorbancia a 550 nm hasta alcanzar una densidad óptica de 0,4 (aprox. 10 millones de células/ml). Las bacterias fueron colocadas por 10 min.

en hielo, centrifugadas a 2.500g durante 10 min. a 4°C y el pellet obtenido disuelto en 10 ml de CaCl<sub>2</sub> 50mM. Se mantuvo en hielo durante 20-30 min. y se volvió a centrifugar a 2.500g; el *pellet* obtenido luego fue resuspendido con CaCl<sub>2</sub> 50mM en un volumen 1/15 del original y alicuotado cada 100 µl para luego conservarse a -80°C.

## 8.2 Transfección de bacterias E. coli DH-5

Una alícuota de bacterias competentes fue puesta en contacto con 200 nanomoles del plásmido de interés y colocada en hielo durante 30 min. para su adsorción. Se le aplicó un *shock* térmico de 2 min. a 42°C y luego nuevamente en hielo durante 10 min. Las bacterias fueron amplificadas por una hora a 37°C mediante la adición de 1 ml de medio LB. Se tomaron 25 µl de las células en suspensión; se plaquearon en medio LB-Agar- ampicilina (medio LB + 10 g/l de agar + 50ug/ml de ampicilina) y se colocaron en estufa a 37°C hasta el otro día.

## 8.3 Amplificación de plásmidos

De las colonias que habían crecido en la placa con medio selectivo, se seleccionó aquella de mayor tamaño y que se encontraba aislada de cualquier otra. Ésta fue cultivada en 250 ml de medio LB durante una noche y luego para la purificación del plásmido propiamente dicho se utilizó el kit *Wizard Plus Maxipreps DNA Purification System* (Promega USA) siguiendo el protocolo correspondiente. Una vez obtenida y eluida la construcción de la columna de purificación, se determinó la

concentración de la misma a través de la medición por Nanodrop (Thermocientific, USA).

#### 8.4 Transfección de células

Células FRTL-5 fueron cultivadas en placa P24 (100.000 células / pocillo) con medio 6H más 5 % de SFB hasta alcanzar una confluencia de 70-80 %, luego fueron cotransfectadas con 0,5 µg de DNA plasmídico / pocillo (0,25 µg B-gal : 0,25 µg región promotora de interés- *Nis*, *Pds*, *Tpo*, *Tg*, *Duox1*, *Duox2*, *Nkx2-1*, *Foxe 1* y *Pax8*) en placa P24 durante 90 minutos mediante el uso del kit “*TransFast Transfection Reagent* – Promega” y la aplicación de su correspondiente protocolo.

Luego se les aplicó los tratamientos descritos en B-1.1 durante un período de 24 h.

Posteriormente se midió la actividad de quimioluminiscencia de cada pocillo en contador de centelleo mediante el uso del Kit “*Luciferase Assay System* – Promega”. La actividad B-galactosidasa se midió, luego de dos horas, a 405 nm para normalizar la efectividad de transfección; para esto se procedió a tomar 100 µl del lisado celular obtenido a partir de la aplicación del protocolo del kit *Luciferase Assay System*, y se le adicionó 150 µl de solución ONPG ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  120 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  80 mM, KCl 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, 100 mM b-mercaptoetanol y 1 mg/ml de orto-nitrofenil-beta- galactosido – ONPG). Los resultados se expresan en

unidades arbitrarias de densidad óptica, referidas en unidades porcentuales respecto al control.

Gen	Nombre	Descripción	Posición del ATG	Cita
<i>Nis</i>	NUE-NIS -2,8 kb	Prom prox + potenciador	-2841 a +101 bp	Costamagna et al, 2004
<i>Tpo</i>	TPO -420	Prom prox	-420 a +50 bp	Ortiz et al, 1999
<i>Tg</i>	Tg -688	Prom prox	-688 a +9 bp	Shimura et al, 2001
<i>Pds</i>	PDS -3,0 kb	Prom prox + potenciador	-3085 a -38 bp	Dentice et al, 2005
<i>Duox1</i>	Tx 43	Prom prox	-563 a +141 bp	Pachucki et al, 2004
<i>Duox2</i>	Tx 41	Prom prox	-470 a +102 bp	Pachucki et al, 2004
<i>Pax8</i>	CNS-87	Potenciador	-84,6 a -84,4 kb	Nitsh et al, 2010
<i>Foxe1</i>	0	Prom prox + potenciador	-1800 a +590 bp	Brancaccio et al, 2004
<i>Nkx2-1</i>	TTF1- 4,11 kb	Prom prox + potenciador	-4110 a -13 bp	Oguchi et al, 1998

**Tabla 5:** plásmidos reporteros utilizados para determinar la actividad de los factores de transcripción sobre las secuencias de DNA

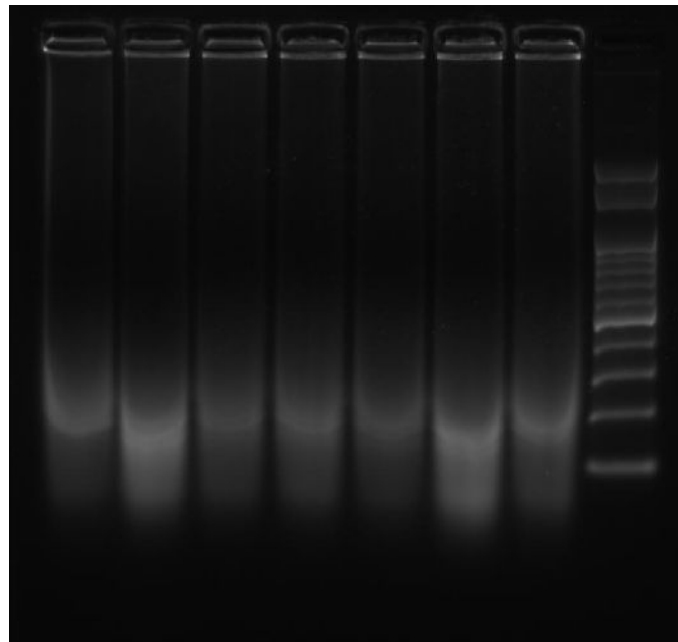
## 9) Estudio de la interacción de los factores de transcripción (PAX8, NKX2-1 y FOXE1) con el DNA de genes tiroideos.

### 9.1 Análisis por Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)- PCR en tiempo real

Células FRTL-5 fueron cultivadas tal como se describió en B.1. Luego se aplicó formaldehído (37 % vol/vol) a las placas en el medio hasta una concentración del 1 % durante 10 min. a temperatura ambiente para lograr la inhibición de la disociación de las proteínas de unión al DNA



(factores de transcripción). Posteriormente la acción del aldehído fue bloqueada durante 15 min. mediante la adición de 1 ml de glicina 1,5 M. Las células aún adheridas a la placa de cultivo fueron lavadas 2 veces con PBS suplementado con 1mM PMSF y posteriormente despegadas de forma mecánica en la misma solución. Se procedió al lisado de las células utilizando *buffer* A (10 mM HEPES pH 7,9; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA) y se obtuvieron núcleos celulares intactos al centrifugar a 10.000g durante 3 min. A continuación, el DNA obtenido a partir de estos últimos por acción del *buffer* de Lisis (50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA y 1 % SDS) en hielo durante 10 min. fue sometido a 15 ciclos de ultrasonido de 15 seg activos + 15 seg pasivos, hasta obtener segmentos de  $300 \pm 100$  bp aproximadamente (diseños 15x15x15 con potencia del 60 % en sonicador Vibra Cell<sup>™</sup> de Sonic Materials Inc, USA). Se confirmó mediante gel de agarosa 2% el tamaño de los segmentos obtenidos utilizando *ladder* de DNA de 100 bp (Promega, Cat: G2101, USA (Figura 17)).



**Figura 17:** Se observa el tamaño del DNA fragmentado por sonicación con ciclos de 15x15x15.

Luego se realizó el paso de preaclorado utilizando *beads* de agarosa o sefarosa, para ello se incubaron 200  $\mu$ l de DNA sonificado diluidos en 1 ml de *buffer* IP (150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 5mM EDTA; 0,5% Nonidet 40; 1% Triton X-100 y 0,1% SDS). Este punto permitió la eliminación de aquellos segmentos con afinidad inespecífica por los *beads* y del DNA que no había sido particionado por el proceso de sonicación y restos de membrana nuclear. Por último la inmunoprecipitación de los factores transcripción (PAX8, NKX2-1 y FOXE1) asociados a secuencias promotoras de *Nis*, *Tpo*, *Tg* y secuencias potenciadoras definidas de *Nis* y *Pax8*, se realizó mediante la incubación a 4°C durante una noche con 2  $\mu$ g del anticuerpo del factor correspondiente.

Al día siguiente las muestras fueron incubadas con 60 µl de *beads* de agarosa durante 4 horas y luego precipitadas a 3.000g durante 1 min. Los segmentos de DNA inmunoprecipitados fueron lavados en 4 oportunidades con *buffer* IP durante 10 min. Para liberar las secuencias de DNA unidas a proteínas se procedió a hervir las muestras durante 10 min. en 250 µl de *Chelex 100 sodium form* (Sigma-Aldrich, USA) 20% peso/vol. Luego el DNA fue tratado con 50 µg de proteinasa K durante 1h a 45°C:

Para inactivar la enzima, las muestras fueron nuevamente hervidas por 15 min. Por último, se centrifugó las muestras a 3.000g durante 2 min. y el sobrenadante fue utilizado para la realización de las PCR en tiempo real utilizando los cebadores que se describen en la tabla 6.

Nombre	Secuencia 5´-3´	Posición del ATG	TA
NIS proximal sentido	TGAGCCGTCCATAGCCTTTC	-326 bp	57°C
NIS proximal anti-sentido	GCACCCTTTCGGTCCTGG	-178 bp	
TPO proximal sentido	TGCTAAGTCTGGGCTGTGTG	-683 bp	55°C
TPO proximal anti-sentido	GGACAAGAAAGGGACCTGGG	-566 bp	
Tg proximal sentido	CTAGCCTCACATTTCTTGTCCCC	-246 bp	54°C
Tg proximal antisentido	GGGGTAGGACCAGTGTCCCATCT	- 21 bp	
NIS potenciador sentido	GCGCACTCCATCCAGATCAT	-2513 bp	57°C
NIS potenciador anti-sentido	TTGGCCTCTTGGTGGTGAAG	-2264 bp	
Pax-8 potenciador sentido	TGA ACTATCCAGCATCGCACA	-84,6 kb	55°C
Pax-8 potenciador anti-sentido	AGTGTTC AAGCTGGGGCTTT	-84,4 kb	

Duox-2 sentido	AAAGTGCATCCAGGAAGGTG	+488 bb	54°C
Duox-2 antisentido	TGAACATCCTGGGCAGGAGTG	+708 bp	

**Tabla 6:** cebadores utilizados para la detección y cuantificación de la asociación de los factores de transcripción (Pax-8, TTF-1 y Foxe-1) al DNA en regiones definidas.

Los resultados obtenidos se expresan como magnitudes de cambio respecto de la muestra control. Además, fueron analizados y cuantificados utilizando la técnica 2 Ct (Livak & Schmittgen 2001). Los ensayos se consideraron conformes cuando la eficiencia fue  $> 0,95$  y  $< 1,05$  y  $R^2 > 0,96$ .

**D) Estudio de la acción del 2-IHDA sobre la modulación de los PPARs y su efecto en genes tiroideos.**

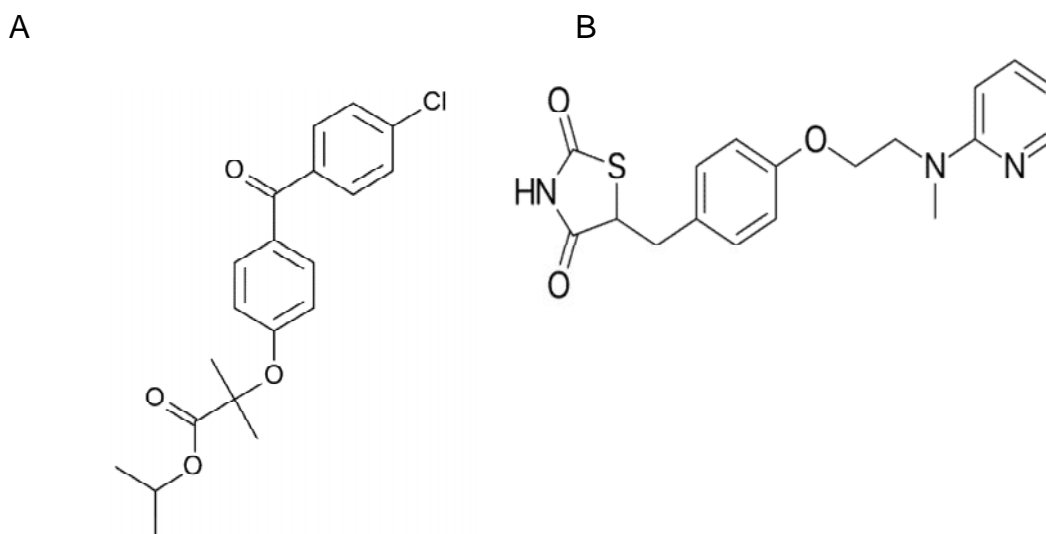
**1) Análisis de activación de los PPARs por el 2-IHDA**

Células FRTL-5 fueron cultivadas y cotransfectadas en placa P24 tal como se describe en C-8.4. Los tratamientos aplicados se realizaron en un lapso de 24 h utilizando el iodolípido en estudio y agonistas específicos de cada uno de los PPARs. Para PPAR alfa se utilizó la droga fenofibrato y para PPAR gamma se usó Rosiglitazona maleato (Figura 18). Las tres drogas fueron aplicadas en las mismas dosis. Los tratamientos realizados fueron:

- Medio 5H (CONTROL)
- Medio 6H (T)
- T + 2-IHDA 30  $\mu$ M (T + 2-IHDA 30)
- T + 2-IHDA 10  $\mu$ M (T + 2-IHDA 10)
- T + Fenofibrato 30  $\mu$ M (T + Fenofibrato 30)
- T + Fenofibrato 10  $\mu$ M (T + Fenofibrato 10)
- T + Rosiglitazona maleato 30  $\mu$ M (T + Rosiglitazona 30)
- T + Rosiglitazona maleato 10  $\mu$ M (T + Rosiglitazona 10)

La cotransfección se llevo a cabo con el plásmido reportero (PPRE X3-TK Luc) para la actividad de los tres subtipos de PPARs (Forman et al, 1995) y el plásmido normalizador B-gal en proporción 0,25  $\mu$ g : 0,25  $\mu$ g/pocillo. La efectividad de la transfección fue normalizada mediante la actividad beta-galactosidasa, para ello se empleó la misma técnica descrita en el punto C-8.4.

Para poder discriminar la actividad relativa de cada uno de los tres subtipos de PPARs, se utilizaron quimeras de PPARs + GAL4, cuya actividad fue reportada por el plásmido UASP X4 (Forman et al., 1995). En otras palabras, se realizó una cotransfección utilizando plásmido quimera + plásmido reportero de la actividad de la quimera + plásmido normalizador, en proporciones 0,15  $\mu$ g: 0,15  $\mu$ g: 0,20  $\mu$ g/pocillo. El proceso de transfección, medición de la quimioluminiscencia y normalización de la efectividad de transfección utilizada son los mismos descritos anteriormente. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de densidad óptica, referidas en unidades porcentuales respecto al control.



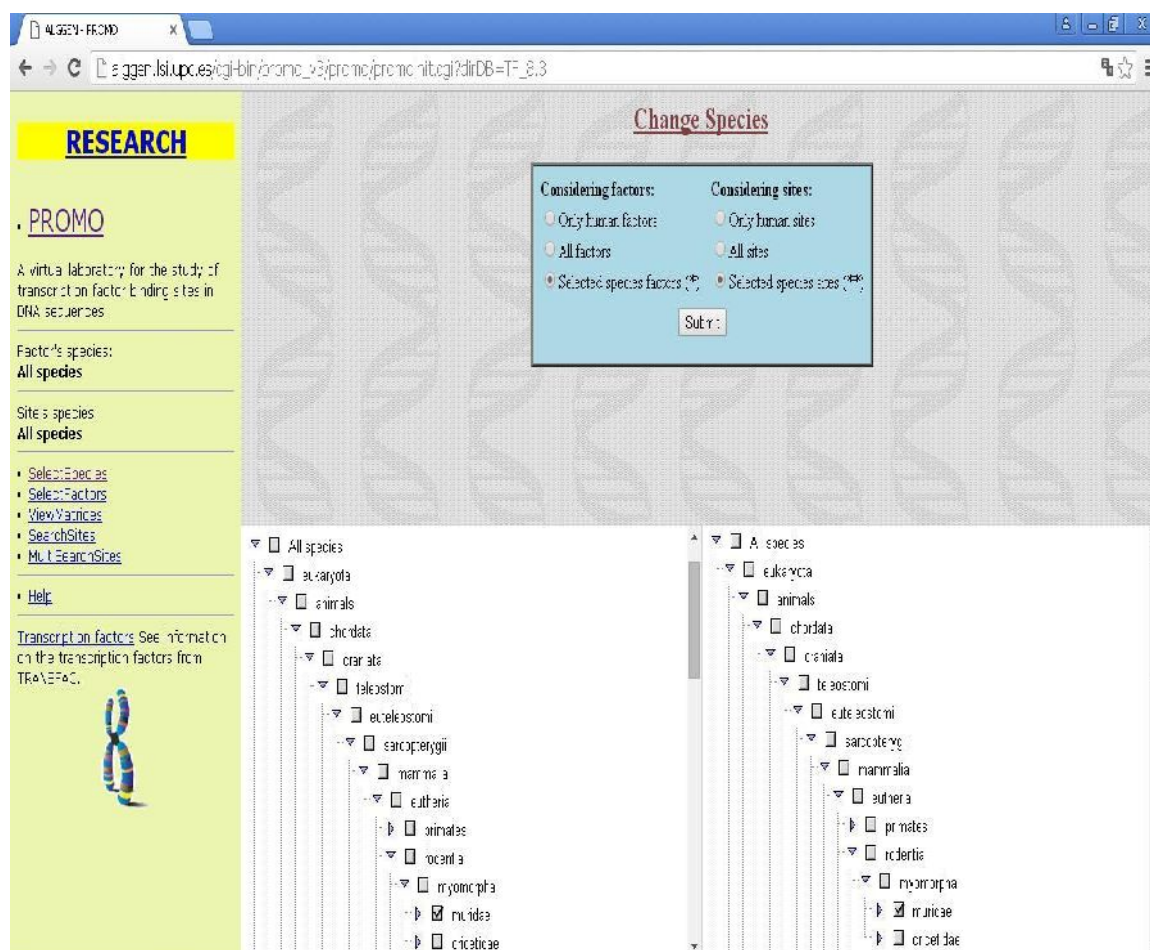
**Figura 18:** se muestra la estructura molecular de los agonistas específicos para PPAR. A) Molécula de fenofibrato agonista específico del subtipo alfa. B) una molécula de rosiglitazona maleato agonista del subtipo gamma.

## 2) Definición y estudio de los sitios putativos de interacción entre los PPARs y el DNA de las regiones promotoras de genes tiroideos

### 2.1 Análisis informático de los potenciales sitios de interacción de PPARα y PPARγ sobre secuencias cóntigo de genes tiroideos.

Las secuencias contiguo de DNA en dirección 3'-5' (corriente arriba) a partir del sitio ATG para los genes *Nis*, *Tpo*, *Tg*, *Foxe1*, *Nkx2-1* fueron obtenidas del sitio de internet "Pub Med", mientras que para *Pax8* se dispuso de las secuencias CNS 87 definida por Nitsh et al., (2010) como posible potenciador. Todas estas secuencias fueron analizadas con la aplicación PROMO 3.0 tal como se muestra en la figura 17.

Los resultados obtenidos de sitios potenciales interacción de los PPARs permitieron diseñar cebadores que flanquearan dichas secuencias. Los oligonucleótidos fueron diseñados con la aplicación “Primer Blast” perteneciente al sitio PubMed (Tabla 7). También para observar si los sitios están conservados evolutivamente, las secuencias fueron alineadas con el DNA humano mediante el programa *Blastn suite* también perteneciente al sitio PubMed.



**Figura 19:** se observa la aplicación Promo 3.0 y los criterios de selección de especie y sitios de búsqueda.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Posición del ATG	TA
NIS PPARa (-1880bp) sentido	CTGCTAGGTGGGAATGAGGC	-1909 bp	57 °C
NIS PPARa (-1880bp) anti-sentido	TCAAAACCAGGCACCGTGAT	-1770 bp	
NIS PPARa (-605bp) sentido	AGGTCAGGACAACATGCCAG	-671 bp	55 °C
NIS PPARa (-605bp) anti-sentido	ACCTTGCCCTTCAGCTAACC	-493 bp	
NIS PPARg (-2781bp) sentido	GGCACTCACAACATGTACCG	-2815 bp	56 °C
NIS PPARg (-2781bp) anti-sentido	GGGTTGACAGAGGGTTGGTG	-2722 bp	
NIS PPARg (-266bp) sentido	TGAGCCGTCCATAGCCTTTC	-326 bp	57 °C
NIS PPARg (-266bp) anti-sentido	GCACCCTTTCGGTCCTGG	-178 bp	
TPO PPARg (-618) sentido	TGCTAAGTCTGGGCTGTGTG	-683 bp	55 °C
TPO PPARg (-618) anti-sentido	GGACAAGAAAGGGACCTGGG	-566 bp	
TPO PPARg (-887) sentido	TGGTCAGTTGAAGAGCCAGAC	-914 bp	55 °C
TPO PPARg (-887) anti-sentido	AAGCATCCATCCACCTTTCCC	-806 bp	
Tg PPARg (-220) sentido	CTAGCCTCACATTTCTTGTC CCC	-246 bp	54°C
Tg PPARg (-220) antisentido	GGGGTAGGACCAGTGTCCCATCT	-21 bp	
CNS87 PPARa-g (-80 kb) sentido	TGAACTATCCAGCATCGCACA	-84,6 kb	55 °C
CNS 87 PPARa-g (-80 kb) anti-sentido	AGTGTTCAAGCTGGGGCTTT	-84,4 kb	
FOXE 1PPAR a (-1812) y g (-1795) sentido	TTCAAGGGCATACTCCTGCG	-1841 bp	55 °C
FOXE 1 PPAR a (-1812) y g (-1795) anti-sentido	GGAGAAAGGAGGCAGAGAGC	-1751 bp	
FOXE 1 PPARg (-1736) sentido	TTTCTCCAAAGGCAGCCAGT	-1758 bp	55 °C
FOXE 1 PPARg (-1736) anti-sentido	TTCAGGTGTAACGTGGGTGG	-1672 bp	
NKX2-1 PPARa (-884 & -840) sentido	CGCTGGGATTCTCTGGGGTA	-997 bp	56 °C
NKX2-1 PPARa (-884 & -840) anti-sentido	GGAAAAGAAGGCTGAGGAG	-707 bp	

**Tabla 7:** cebadores utilizados para determinar la interacción de PPARa o PPARg con el DNA.



## 2.2 Análisis de los sitios putativos de acción de los PPARs, por CHIP- PCR en tiempo real

Células FRTL-5 fueron cultivadas tal como se describió en D.1. Luego las placas fueron sometidas al protocolo descrito en C-9.1 y la inmunoprecipitación de los factores de transcripción de interés asociados a las secuencias de DNA de *Nis*, *Tpo*, *Tg*, *Foxe1*, *Nkx2-1* y *Pax8* fueron incubados a 4°C durante una noche con 2 µg del anticuerpo de interés (PPARα y PPARγ).

Los resultados obtenidos por qPCR se expresan como magnitudes de cambio respecto de la muestra control. Además, fueron analizados y cuantificados utilizando la técnica 2<sup>-Ct</sup> (Livak & Schmittgen 2001). Los ensayos se consideraron conformes cuando la eficiencia fue > 0,95 y < 1,05 y R<sup>2</sup> > 0,96.

## 3) Estudio de la modulación del RNAm por activación e inhibición de los PPARs

### 3.1 Estudio de la modulación del RNAm de los PPARs por medio de sus agonistas, 2-IHDA y RNA pequeños de interferencia (siRNAs)

Se cultivaron células FRTL-5 hasta 80-90% de confluencia en placa p100 con medio 6H. Luego se retiró dicho medio y aplicó medio 5H durante 72h. Al finalizar, las células fueron despegadas de la placa mediante la acción de la enzima tripsina. Una vez despegadas las

células, se bloqueó la acción de la misma con igual volumen de SFB. Las células fueron recogidas en un tubo tipo *Falcon* de 15 ml y se procedió a centrifugarlas durante 5 min a 800g. Se descartó el sobrenadante y resuspendió el botón de células en 4 volúmenes de medio 5H. Inmediatamente, un subgrupo de células fue utilizado para inhibir la producción de PPARs a través de reverso-transfección con (120 picomoles de concentración final/3.000.000 células) siRNA para PPARα (Ambion USA, Cat: s130648) y para PPARγ (Ambion USA, cat:s130411) aplicando el protocolo propuesto por el kit siPORT<sup>™</sup> NeoFX<sup>™</sup> Transfection Agent (Ambion, USA) . Los tratamientos se llevaron a cabo durante 24h y se desarrollaron según se menciona en tabla 8.

Luego las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X frío y se aplicó *TRIZOL Reagent* (Invitrogen, USA) directamente sobre las células. Paso siguiente, se aplicó el protocolo correspondiente, llevándose a cabo la dilución final en agua libre de RNAsa y DNAsa para biología molecular (Biodynamics, Argentina). La RT-PCR se desarrolló de igual manera que lo descrito en el punto C-7.1 Posteriormente se llevó a cabo la qRT-PCR según lo descrito en C-7.3 para los genes PPARα y PPARγ. Para ello se utilizaron los cebadores mencionados en la tabla 9.

Medio 5H (CONTROL)
Medio 6H (T)
T + 2-IHDA 30 $\mu$ M
T + 2-IHDA 10 $\mu$ M
T + Fenofibrato 30 $\mu$ M
T + Fenofibrato 10 $\mu$ M
T + Rosiglitazona maleato 30 $\mu$ M
T + Rosiglitazona maleato 10 $\mu$ M
T + siRNA PPAR $\alpha$
T + siRNA PPAR $\alpha$ + 2-IHDA 30 $\mu$ M
T + siRNA PPAR $\alpha$ + Fenofibrato 30 $\mu$ M
T + siRNA PPAR $\alpha$ + Rosiglitazona maleato 30 $\mu$ M
T + siRNA PPAR $\gamma$
T + siRNA PPAR $\gamma$ + 2-IHDA 30 $\mu$ M
T + siRNA PPAR $\gamma$ + Fenofibrato 30 $\mu$ M
T + siRNA PPAR $\gamma$ + Rosiglitazona maleato 30 $\mu$ M

**Tabla 8:** tratamientos aplicados durante 24 h a células FRTL-5 para estudiar la acción del 2-IHDA a través de los PPARs utilizando para ello 2-IHDA, agonistas y siRNA específicos de cada subtipo de PPAR.

Nombre	Secuencia 5'->3'	TA
PPARa sentido	TCACACAATGCAATCCGTTT	58°C
PPARa antisentido	GGCCTTGACCTTGTTTCATGT	
PPARg sentido	CCTTTGGTGACTTTATGGAG	58°C
PPARg antisentido	GGTGAAGGTATATCTGTC	

**Tabla 9:** cebadores utilizados en qRT-PCR para determinar la modulación de los PPARs bajo efecto de sus agonistas, 2-IHDA y de silenciamiento con siRNA.

#### 4) Estudio de la captación de $^{125}\text{I}$ por activación e inhibición de los PPARs

Células FRTL-5 fueron cultivadas en placas tipo P24 tal como se describió en B-1.1. Luego se aplicó 1  $\mu\text{Ci}$  / pocillo de  $^{125}\text{I}$  (New England Nuclear, USA) y se incubó en estufa a 37 °C durante 45 min. y rápidamente fueron lavadas tres veces con buffer fosfato salino (PBS – NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM;  $\text{NaHPO}_4$  10 mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM ) 1X más KI 1 $\mu\text{M}$ ; posteriormente se le aplicó 0,5 ml de NaOH 0,3 M durante 48 h. Luego se tomó 0,1 ml de cada pocillo y se procedió a medir la radioactividad. Los resultados fueron normalizados midiendo la cantidad de proteína contenida en cada pocillo por el método de Lowry et al, (1951). Los resultados son expresados como cuentas por minuto (CPM) /  $\mu\text{g}$  de proteína.

### E) Estudio de la regulación epigenética de los genes tiroideos a través del estudio de la acetilación de Histona H3 por Chip- PCR en tiempo real

Células FRTL-5 fueron cultivadas tal como se describió en B-1.1. Luego a las placas se les aplicó el tratamiento descrito en 9.1 y por último se obtuvo la inmunoprecipitación de las Histonas H3 acetiladas asociadas al DNA al incubar con 2  $\mu$ g del anticuerpo “Ac-Histone H3 Antibody (Lys9/14)” de la empresa Santa Cruz biotechnology (nº cat sc-8655). Los resultados obtenidos fueron analizados y cuantificados utilizando la técnica 2<sup>-Ct</sup> (Livak & Schmittgen 2001). Los ensayos se consideraron conformes cuando la eficiencia fué  $> 0,95$  y  $< 1,05$  y  $R^2 > 0,96$  (Tabla 10).

Nombre	Secuencia 5'-3'	Posición del ATG	TA
NIS Exon 1 (-140bp) sentido	TGAGCCGTCCATAGCCTTTC	-140 bp	57 °C
NIS Exon 1 (+357bp) anti-sentido	GCACCCTTTTCGGTCCTGG	+357 bp	
TPO Proximal (-683) sentido	TGCTAAGTCTGGGCTGTGTG	-683 bp	55 °C
TPO Proximal (-566) anti-sentido	GGACAAGAAAGGGACCTGGG	-566 bp	
Tg proximal (-246) sentido	CTAGCCTCACATTTCTTGTCCTCC	-246 bp	54°C
Tg proximal (-21) anti-sentido	GGGGTAGGACCAGTGTCCCATCT	-21 bp	

**Tabla 10:** cebadores utilizados para la cuantificación de la acetilación de histona H3 en las regiones promotoras allí mencionadas.

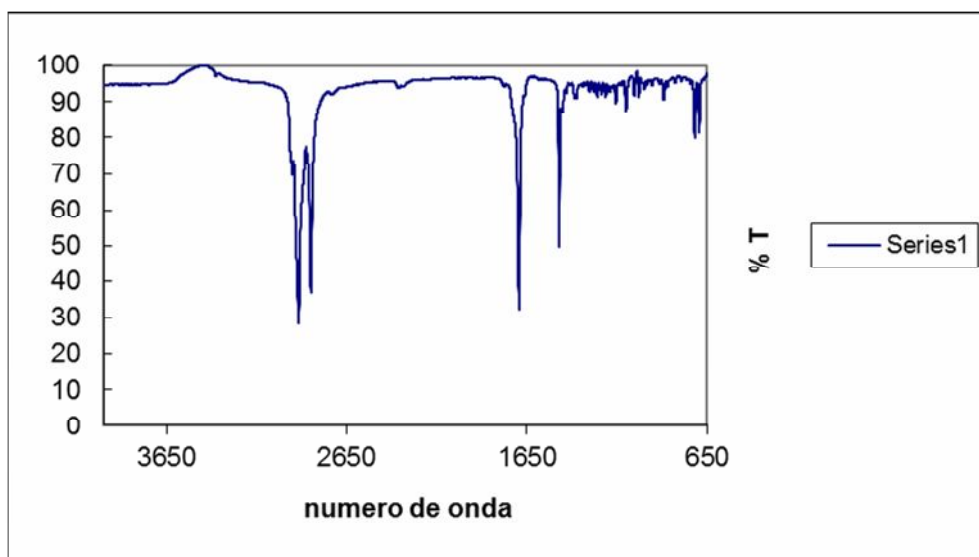
**F) Análisis estadístico de los datos**

Para los datos que cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas se utilizó el ANOVA haciendo las comparaciones con el test Student- Newman- Keuls (para comparaciones múltiples) para ello se utilizó el programa InfoStat. Todos los ensayos comprendidos en las secciones B, C, D y E se realizaron 4-6 veces y por cuadruplicado.

## **Resultados**

### **A) Estabilidad del 2-IHDA**

Con el fin de estudiar la estabilidad del iodolípido sintetizado según se detalla en materiales y métodos sección A, el mismo fue incubado en medio 6H durante períodos de tiempo de 24, 48 y 72 h. y analizado por HPLC, resonancia magnética nuclear e infrarrojo (Figura 20). El resultado obtenido demostró que el compuesto es estable y no se deshalogena bajo nuestras condiciones de trabajo.



**Figura 20:** Análisis de 2-IHDA por infrarrojo. El iodolípido fue incubado en medio 6H durante 72h a 37°C en presencia de 5% CO<sub>2</sub> y humedad relativa >98%.

### **B) Efectos del 2-IHDA sobre la proliferación de la célula tiroidea**

Para realizar los ensayos de proliferación celular, las células fueron cultivadas hasta un 80% de confluencia y luego privadas de la acción de la TSH durante 72, al cabo de dicho tiempo se aplicaron los distintos tratamientos

durante distintos períodos de tiempo: 24, 48 y 72 h. La viabilidad celular fue evaluada mediante el ensayo de exclusión con azul tripán y con MTT como método colorimétrico. Se demostró que tanto el KI como el 2-IHDA poseen efectos inhibitorios significativos sobre las células FRTL-5 y que estos efectos fueron dosis dependiente. En ambos casos a mayor dosis, mayor fue el efecto de inhibición (Tablas 11 y 12).

	24 h	48 h	72 h
Control	100,00	100,00	100,00
TSH (T)	121,27 ± 1,03 <sup>000</sup>	145,71 ± 1,11 <sup>000</sup>	218,48 ± 2,41 <sup>000</sup>
T + 2-IHDA 5	116,42 ± 1,72	132,54 ± 1,59 <sup>**</sup>	194,65 ± 3,26 <sup>***</sup>
T + 2-IHDA 10	107,64 ± 1,78 <sup>***</sup>	116,13 ± 0,82 <sup>***</sup>	162,46 ± 1,68 <sup>***</sup>
T + 2-IHDA 30	99,09 ± 1,18 <sup>***</sup>	87,99 ± 0,59 <sup>***</sup>	112,48 ± 0,89 <sup>***</sup>
T + KI 5	120,51 ± 0,36	138,48 ± 2,40	203,04 ± 5,08 <sup>*</sup>
T + KI 10	116,15 ± 1,31	127,00 ± 0,49 <sup>**</sup>	182,83 ± 1,95 <sup>***</sup>
T + KI 30	108,96 ± 1,87 <sup>***</sup>	123,59 ± 1,54 <sup>***</sup>	161,59 ± 3,12 <sup>***</sup>

**Tabla 11:** Efecto del KI y del 2-IHDA sobre la viabilidad de células FRTL-5. Resultados obtenidos a partir de la técnica de MTT a diferentes tiempos (24, 48 y 72 h). Los mismos son expresados como la media ± ESM de cada grupo. <sup>000</sup>p< 0,001 vs. Control; <sup>\*</sup>p< 0,05, <sup>\*\*</sup>p< 0,01 y <sup>\*\*\*</sup>p< 0,01 vs. TSH.

	24 h	48 h	72 h
Control	100,00	100,00	100,00
TSH (T)	129,42 ± 1,94 <sup>000</sup>	165,13 ± 1,98 <sup>000</sup>	199,72 ± 3,62 <sup>000</sup>
T + 2-IHDA 5	110,78 ± 1,72 <sup>***</sup>	127,76 ± 3,24 <sup>***</sup>	154,22 ± 1,80 <sup>***</sup>
T + 2-IHDA 10	96,80 ± 1,66 <sup>***</sup>	114,27 ± 2,50 <sup>***</sup>	119,05 ± 3,69 <sup>***</sup>
T + 2-IHDA 30	75,07 ± 2,33 <sup>***</sup>	82,99 ± 5,01 <sup>***</sup>	81,39 ± 4,97 <sup>***</sup>
T + KI 5	122,61 ± 3,88	139,22 ± 1,98 <sup>***</sup>	164,61 ± 5,11 <sup>***</sup>
T + KI 10	109,87 ± 2,29 <sup>***</sup>	128,75 ± 2,23 <sup>***</sup>	131,20 ± 3,42 <sup>***</sup>
T + KI 30	94,49 ± 3,12 <sup>***</sup>	107,88 ± 4,63 <sup>***</sup>	108,23 ± 4,43 <sup>***</sup>

**Tabla 12:** Efecto del KI y del 2-IHDA sobre la proliferación de células FRTL-5. Resultados obtenidos por la técnica de exclusión con azul de tripan a diferentes tiempos (24, 48 y 72 h). Los mismos son expresados como la media ± ESM de cada grupo. <sup>000</sup>p< 0,001 vs. Control; <sup>\*</sup>p< 0,05, <sup>\*\*</sup>p< 0,01 y <sup>\*\*\*</sup>p< 0,01 vs. TSH.

Estos resultados, ya publicados previamente, nos sirvieron como control para demostrar que el 2-IHDA efectivamente actúa en nuestro modelo.



### C) Efectos del iodolípido sobre la función de la célula tiroidea

#### 1) Estudio de la captación de $^{125}\text{I}$

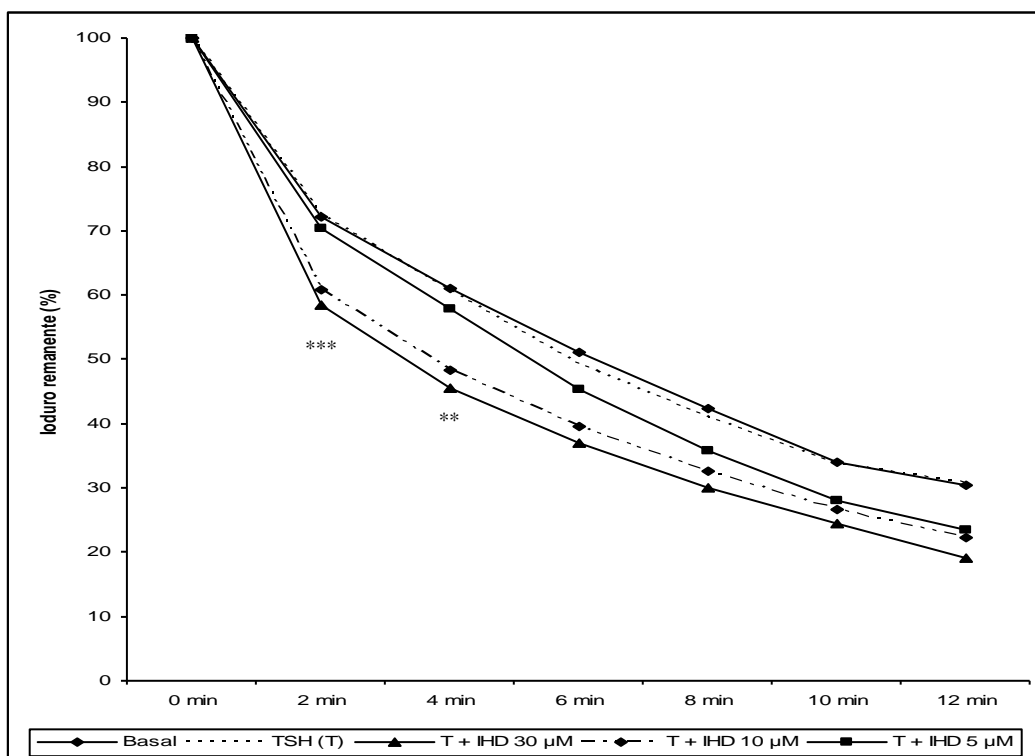
Sabiendo que el 2-IHDA inhibe la proliferación celular se estudió su rol sobre la función tiroidea. Una de las principales funciones diferenciadas de las células tiroideas es la de concentrar iodo, por tanto el transporte desde la membrana basal hacia el citosol se convierte en el factor inicial y limitante de la síntesis de HT. Se investigó el efecto del KI y del 2-IHDA sobre la captación de  $^{125}\text{I}$  inducido por TSH a diferentes concentraciones y períodos de tiempo. Se observó que el 2-IHDA mimetiza y profundiza aun más el efecto inhibitorio generado por el KI y que el efecto se mantiene al menos durante 48h. En este sentido, el 2-IHDA promovió una disminución de la entrada de  $^{125}\text{I}$ : 35, 40 y 70% para las dosis de 5, 10 y 30  $\mu\text{M}$  a las 24 h de tratamiento respectivamente. A las 48 h de tratamiento la disminución fue mayor: 51, 64 y 77% para las dosis antes citadas. Mientras que para KI a las 24 h en las mismas dosis la disminución de la captación fue de 33; 36 y 51 % y 46; 51 y 64% para 48 h (Tabla 13).

	$^{125}\text{I}$ cpm/ $\mu\text{g}$ proteína	
	24 h	48 h
Control	3,18 $\pm$ 0,23	5,04 $\pm$ 1,10
TSH (T)	15,73 $\pm$ 1,01 <sup>°°</sup>	35,98 $\pm$ 2,99 <sup>°°</sup>
T + 2-IHDA 5	10,20 $\pm$ 1,33 <sup>*</sup>	17,35 $\pm$ 0,81 <sup>**</sup>
T + 2-IHDA 10	9,35 $\pm$ 0,41 <sup>*</sup>	12,84 $\pm$ 0,55 <sup>**</sup>
T + 2-IHDA 30	4,68 $\pm$ 0,37 <sup>**</sup>	8,06 $\pm$ 0,80 <sup>**</sup>
T + KI 5	10,39 $\pm$ 0,46 <sup>*</sup>	19,21 $\pm$ 1,60 <sup>**</sup>
T + KI 10	10,05 $\pm$ 0,85 <sup>*</sup>	17,47 $\pm$ 1,22 <sup>**</sup>
T + KI 30	7,60 $\pm$ 0,94 <sup>*</sup>	12,97 $\pm$ 1,26 <sup>**</sup>

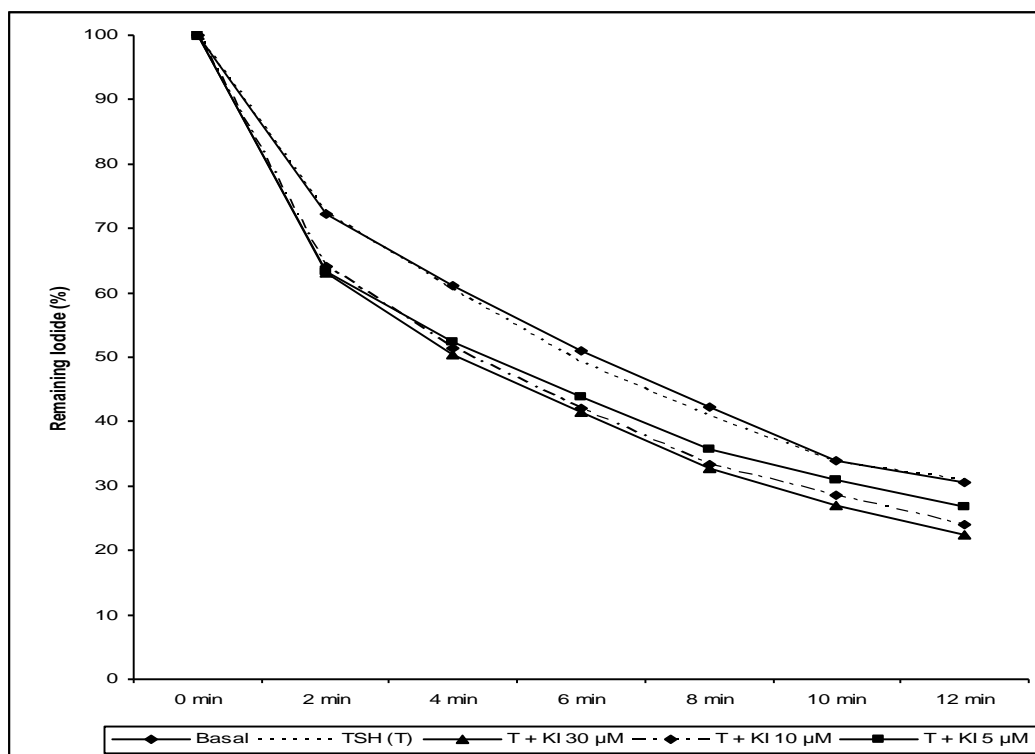
**Tabla 13:** Efecto del KI y del 2-IHDA sobre la captación de ioduro en células FRTL-5 luego de ser tratadas durante 24 y 48 h. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo. <sup>°</sup>p < 0,001 vs. Control; <sup>\*</sup>p < 0,05, <sup>\*\*</sup>p < 0,01 vs. TSH.

## 2) Estudio del Eflujo de $^{125}\text{I}$

Con el objeto de determinar si el 2-IHDA posee efectos sobre el transporte del yoduro desde el citosol hacia el exterior celular (eflujo), células FRTL-5 fueron tratadas y analizadas según se describió en la sección anterior. En los ensayos realizados se observó que el iodolípido estudiado promueve un incremento del 20% en el eflujo del halógeno a la dosis más alta (Figura 21-a). Por el contrario, a las otras dosis se observó una tendencia sin diferencias significativas. Con respecto al KI, se observó que ejerce un incremento sobre el eflujo aunque no estadísticamente significativo (Figura 21-b).



**Figura 21-a:** Efecto del 2-IHDA a diferentes dosis sobre el eflujo de yoduro en células FRTL-5 a 24 h; \* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,05$  vs. TSH.



**Figura 21-b:** Efecto del KI a diferentes dosis sobre el eflujo de yoduro en células FRTL-5 a 24 h; \* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,05$  vs. TSH.

### 3) Estudio de la captación de DOG- $^3\text{H}$

Es sabido que el exceso de yoduro modula el transporte celular a través de la membrana, no solo del yoduro sino también de otros metabolitos. Con tal fin se estudió el efecto del 2-IHDA sobre la captación y eflujo de yoduro y para determinar su efecto generalizado sobre la membrana de la célula tiroidea se observó el efecto sobre la captación de  $^3\text{H}$ -DOG un azúcar no metabolizable.

Se pudo observar que tanto el iodolípido como el KI promueven la inhibición de la captación  $^3\text{H}$ -DOG y el patrón obtenido es dependiente de la concentración y el tiempo ensayado (Tabla 14). La concentración más alta de 2-IHDA promovió sobre la captación una total abolición a las 24 h y un efecto

algo menor se observó a las 48 h. El KI mostró el mismo resultado pero menos pronunciado.

	captación $^3\text{H-DOG}$ (d.p.m./ $\mu\text{g. proteína}$ )	
	24 h	48 h
Control	11,38 $\pm$ 0,32	23,88 $\pm$ 0,58
TSH (T)	14,72 $\pm$ 0,40°	36,33 $\pm$ 0,67°
T + 2-IHDA 5	13,03 $\pm$ 0,39*	33,19 $\pm$ 0,51**
T + 2-IHDA 10	11,34 $\pm$ 0,28***	30,77 $\pm$ 0,49***
T + 2-IHDA 30	9,09 $\pm$ 0,29***	18,23 $\pm$ 0,29***
T + KI 5	13,11 $\pm$ 0,41	33,48 $\pm$ 0,58*
T + KI 10	12,43 $\pm$ 0,37*	31,05 $\pm$ 0,61***
T + KI 30	11,84 $\pm$ 0,31*	26,88 $\pm$ 0,53***

**Tabla 14:** Efecto del KI y del 2-IHDA sobre la captación de  $^3\text{H-DOG}$  en células FRTL-5 luego de 24 y 48 h. Cada valor es el resultado de 4 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo. °p < 0,001 vs. Control; \*\*\*p < 0,001; \*\*p < 0,01; \*p < 0,05 vs. TSH.

#### 4) Estudio de la producción de $\text{H}_2\text{O}_2$ extracelular

La producción de peróxido de hidrógeno en la membrana apical de la célula tiroidea constituye un elemento crucial en la organificación del yodo y síntesis de HT, debido a que actúa como aceptor de electrones. El efecto Wolff-Chaikoff es mediado por la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  donde a medida que aumenta el yoduro aumenta la síntesis de HT, pero superado cierto umbral, la síntesis se suspende. Es decir que el yoduro posee un efecto bivalente dependiente de la concentración. Con la finalidad de determinar si el 2-IHDA genera similares efectos se propuso estudiar este parámetro.

Los resultados obtenidos en los tratamientos de 2-IHDA (Tabla 15), demuestran que existe un estímulo en la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a las dosis más bajas (5  $\mu\text{M}$  = 72% y 10  $\mu\text{M}$  = 54%) y una fuerte inhibición a la dosis más alta

(30  $\mu\text{M}$  = 50%) respecto de TSH. Similares resultados pero menos pronunciados fueron obtenidos con el KI (Tabla 15).

	%
Control	100
TSH (T)	81,8 $\pm$ 1,1
T + 2-IHDA 5	141,1 $\pm$ 4,2***
T + 2-IHDA 10	126,2 $\pm$ 7,5***
T + 2-IHDA 30	40,3 $\pm$ 4,1***
T + KI 5	121,4 $\pm$ 7,7***
T + KI 10	108,2 $\pm$ 1,6***
T + KI 30	76,9 $\pm$ 3,5***

**Tabla 15:** Efecto ejercido por diferentes concentraciones de KI y 2-IHDA sobre la producción extracelular de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en células FRTL-5. Cada valor es el resultado de 4 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo. \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  vs. TSH.

##### 5) Estudio de los niveles intracelulares de $\text{Ca}^{2+}$ libre

De los resultados expuestos en el ítem anterior y en concordancia con el hecho de que las enzimas productoras de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (DUOX1 y DUOX2) son estimuladas en sus dominios intracelulares por el  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la ruta de señalización del inositol fosfato, resultó necesario estudiar si el 2-IHDA modula los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular.

Los datos observados se correlacionaron con los de producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  donde el iodolípido estimula significativamente la liberación de calcio en un 52% a la dosis más baja y hacia las dosis más altas (10 y 30  $\mu\text{M}$ ) se observó una caída del estímulo hasta alcanzar los niveles de TSH. Respecto a KI se observa solo un estímulo significativo a la dosis más alta (Tabla 16).

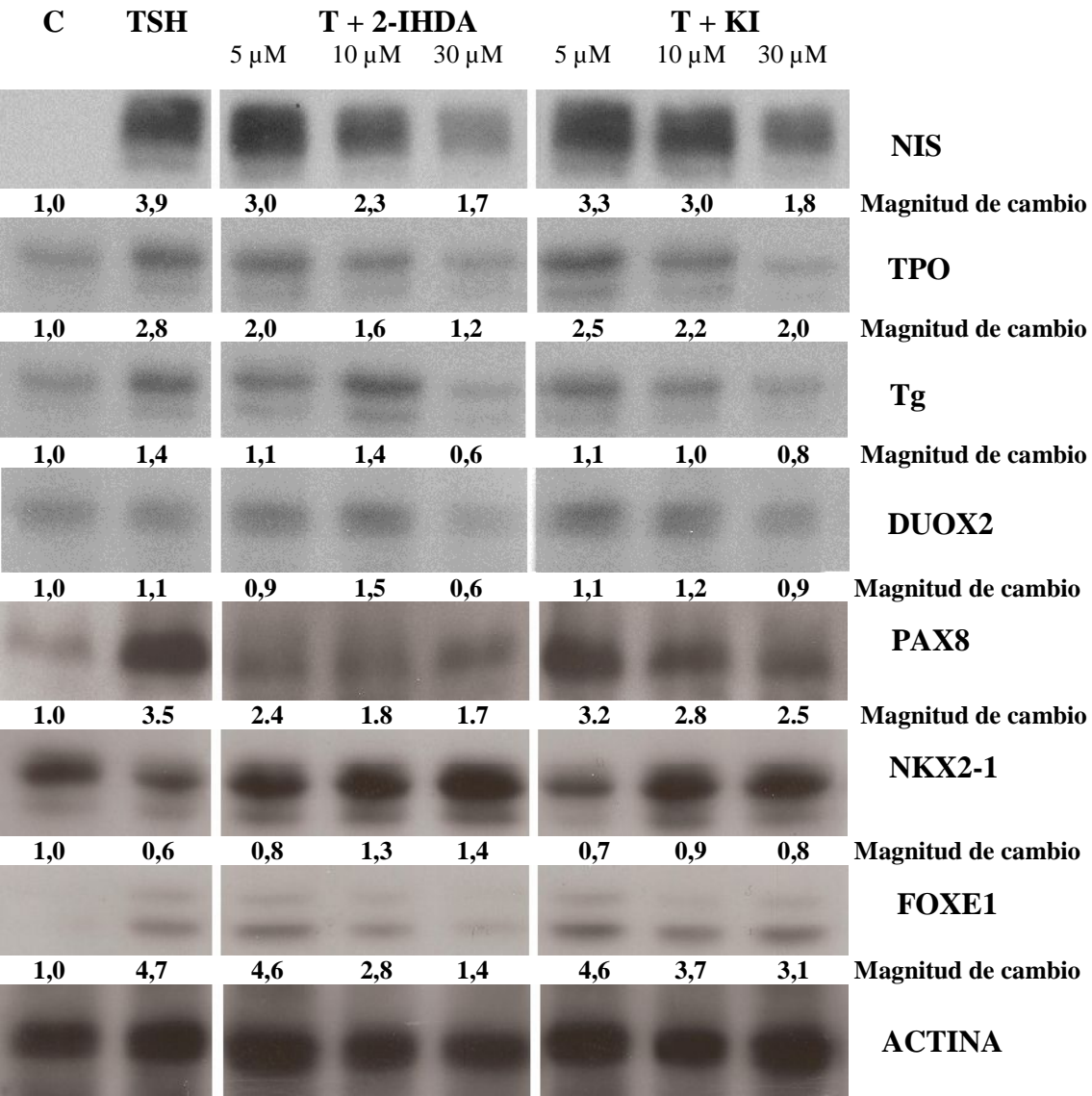
	%
Control	100
TSH (T)	75,4 ± 6,9
T + 2-IHDA 5	114,6 ± 4,2**
T + 2-IHDA 10	102,5 ± 7,5
T + 2-IHDA 30	75,4 ± 4,1
T + KI 5	93,7 ± 7,2
T + KI 10	100,7 ± 4,6
T + KI 30	107,5 ± 7,4*

**Tabla 16:** Efecto ejercido por diferentes concentraciones de KI y 2-IHDA sobre los niveles de  $\text{Ca}^{++}$  libre intracelular en células FRTL-5. Cada valor es el resultado de 4 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  vs. TSH.

## 6) Estudio de las proteínas tiroideas

Con el objetivo de estudiar si los efectos observados sobre los parámetros fisiológicos de la célula tiroidea están correlacionados con los niveles de proteína se desarrolló *Western blot* para proteínas de interés (Figura 22). Mediante la semicuantificación de los niveles proteicos se observó que el 2-IHDA promueve una disminución dosis dependiente de los niveles de NIS, TG y TPO. Por otra parte, el efecto sobre DUOX2 es de estimulación a las dosis más bajas (5 y 10  $\mu\text{M}$ ) y de inhibición a la dosis más alta (30  $\mu\text{M}$ ).

También se procedió a estudiar los niveles proteicos de los principales factores de transcripción. Se determinó que el iodolípido al igual que el KI promueve una disminución dosis dependiente de FOXE-1 y PAX-8, mientras que por el contrario los niveles proteicos de NKX2-1 están aumentados (Figura 22).



**Figura 22:** Efecto ejercido por diferentes concentraciones de 2-IHDA y KI luego de 24 h de tratamiento sobre los niveles proteicos de NIS, TPO, Tg, DUOX2, PAX-8, NKX2-1 y FOXE1 en células FRTL-5. Debajo de cada banda se expresa el valor promedio de 4-6 ensayos realizados.

7) Estudio de los RNAm

Ante los efectos observados sobre los niveles proteicos de las proteínas de membrana y sus factores de transcripción (analizados en el ítem b.6) en respuesta a los tratamientos realizados con 2-IHDA y KI, se propuso estudiar los niveles de RNAm mediante qRT-PCR. En este análisis no solo se estudió

los RNAm ya mencionados sino que también se incluyó a *Duox1* como productor secundario de  $H_2O_2$  y a *Pds* como participe principal en el eflujo de iodo. El resultado obtenido a partir de la cuantificación relativa de los RNAm demostró una firme correlación entre lo observado a nivel fisiológico – proteico y transcripcional (Tabla 17 y Figuras 23 a y b).

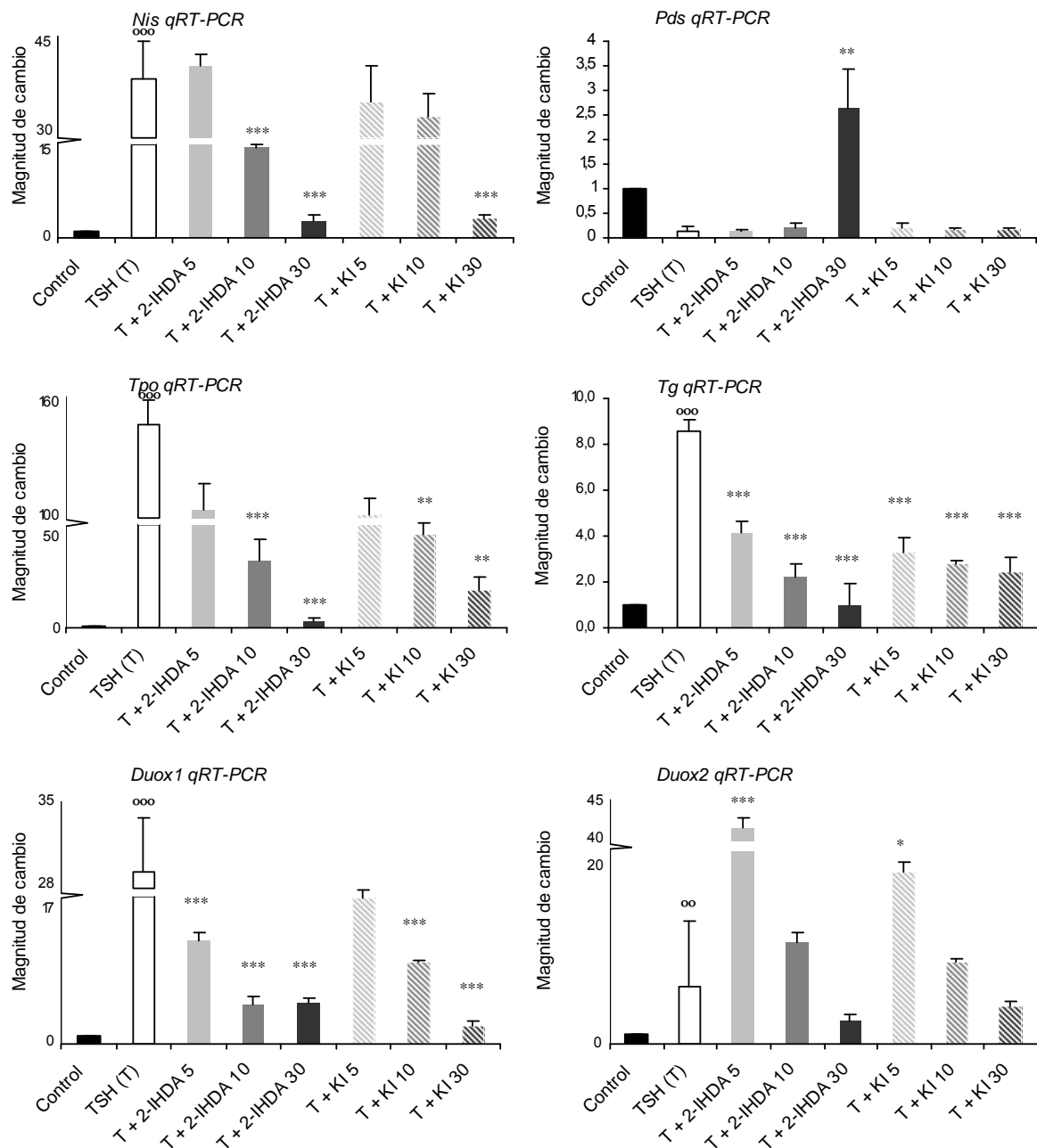
	<i>Nis</i>	<i>Tpo</i>	<i>Tg</i>
Control	1,00	1,00	1,00
TSH (T)	39,50 ± 6,20 <sup>000</sup>	147,50 ± 11,40 <sup>000</sup>	8,59 ± 0,46 <sup>000</sup>
T + 2-IHDA 5	41,80 ± 1,60	108,00 ± 12,40	4,11 ± 0,90 <sup>***</sup>
T + 2-IHDA 10	14,58 ± 0,48 <sup>***</sup>	31,00 ± 10,50 <sup>***</sup>	2,23 ± 0,54 <sup>***</sup>
T + 2-IHDA 30	2,63 ± 0,90 <sup>***</sup>	3,37 ± 1,16 <sup>***</sup>	1,01 ± 0,51 <sup>***</sup>
T + KI 5	35,80 ± 5,90	105,92 ± 7,30	3,26 ± 0,60 <sup>***</sup>
T + KI 10	33,40 ± 3,90	43,57 ± 5,23 <sup>**</sup>	2,77 ± 0,14 <sup>***</sup>
T + KI 30	3,15 ± 0,50 <sup>***</sup>	17,89 ± 5,37 <sup>**</sup>	2,45 ± 0,64 <sup>***</sup>

	<i>Duox1</i>	<i>Duox2</i>	<i>Pds</i>
Control	1,00	1,00	1,00
TSH (T)	29,90 ± 6,30 <sup>000</sup>	5,46 ± 0,41 <sup>00</sup>	0,14 ± 0,08
T + 2-IHDA 5	11,94 ± 0,89 <sup>***</sup>	41,21 ± 5,04 <sup>***</sup>	0,12 ± 0,04
T + 2-IHDA 10	4,47 ± 0,95 <sup>***</sup>	9,70 ± 1,03	0,21 ± 0,09
T + 2-IHDA 30	4,66 ± 0,67 <sup>***</sup>	2,20 ± 0,89	2,64 ± 0,78 <sup>**</sup>
T + KI 5	16,80 ± 0,98	16,45 ± 2,03 <sup>*</sup>	0,20 ± 0,09
T + KI 10	9,47 ± 0,25 <sup>***</sup>	7,91 ± 0,85	0,18 ± 0,03
T + KI 30	1,99 ± 0,58 <sup>***</sup>	3,55 ± 0,72	0,17 ± 0,04

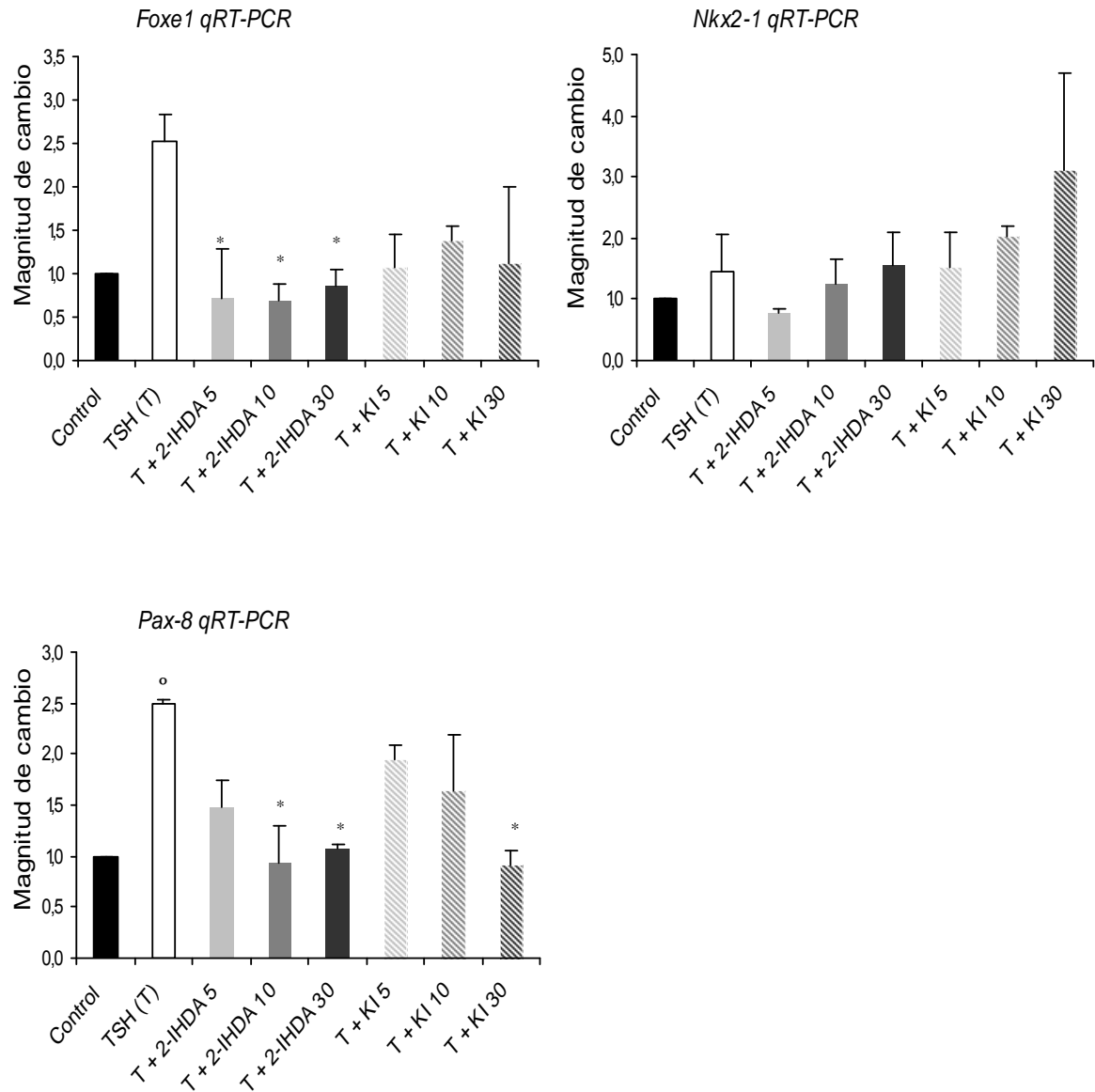
	<i>Pax8</i>	<i>Nkx2-1</i>	<i>Foxe1</i>
Control	1,00	1,00	1,00
TSH (T)	2,50 ± 0,41 <sup>0</sup>	1,46 ± 0,59	2,52 ± 0,31
T + 2-IHDA 5	1,48 ± 0,27	0,77 ± 0,08	0,72 ± 0,56 <sup>*</sup>
T + 2-IHDA 10	0,93 ± 0,36 <sup>*</sup>	1,26 ± 0,38	0,68 ± 0,20 <sup>*</sup>
T + 2-IHDA 30	1,07 ± 0,04 <sup>*</sup>	1,57 ± 0,52	0,85 ± 0,20 <sup>*</sup>
T + KI 5	1,94 ± 0,14	1,53 ± 0,58	1,07 ± 0,38
T + KI 10	1,65 ± 0,54	2,04 ± 0,14	1,38 ± 0,17
T + KI 30	0,92 ± 0,13 <sup>*</sup>	3,12 ± 1,59	1,13 ± 0,88

**Tabla 17:** Cuantificación por PCR en tiempo real del efecto ejercido por diferentes concentraciones de KI y 2-IHDA sobre los niveles de RNAm en células FRTL-5. Los tratamientos fueron aplicados durante 48 h. Cada valor es el resultado de 4 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media ± ESM de cada grupo. <sup>000</sup>p< 0,001; <sup>00</sup>p< 0,01; <sup>0</sup>p< 0,05 vs. Control; <sup>\*\*\*</sup>p< 0,001; <sup>\*\*</sup>p< 0,01; <sup>\*</sup>p< 0,05 vs. TSH.





**Figura 23-a:** Cuantificación por PCR en tiempo real del efecto ejercido por diferentes concentraciones de KI y 2-IHDA sobre los niveles de RNAm de *Nis*, *Pds*, *Tpo*, *Tg*, *Duox1* y *Duox2* respectivamente. Los tratamientos fueron aplicados durante 48 h. Cada valor es el resultado de 4 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo.  $^{ooo}p < 0,001$ ;  $^{oo}p < 0,01$ ;  $^op < 0,05$  vs. Control;  $^{***}p < 0,001$ ;  $^{**}p < 0,01$ ;  $^{*}p < 0,05$  vs. TSH.



**Figura 23-b:** Cuantificación por PCR en tiempo real del efecto ejercido por diferentes concentraciones de KI y 2-IHDA sobre los niveles de RNAm de *Foxe1*, *Nkx2-1* y *Pax8* respectivamente. Los tratamientos fueron aplicados durante 48 h. Cada valor es el resultado de 4 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo. °°°p < 0,001; °°p < 0,01; °p < 0,05 vs. Control; \*\*\*p < 0,001; \*\*p < 0,01; \*p < 0,05 vs. TSH.

## 8) Estudio de las regiones promotoras de los genes tiroideos

Se propuso estudiar el mecanismo por el cual el 2-IHDA y el KI ejercen su regulación transcripcional sobre la expresión de los genes analizados por qRT-PCR. Con tal fin se realizaron ensayos de transfección con plásmidos conteniendo la región promotora de *Nis*, *Tg*, *Tpo*, *Duox1*, *Duox2*, *Pds*, *Nkx2-1*, *Foxe1* y *Pax8* (Tabla 18 y Figuras 24 a, b y c). Se evaluó la intensidad lumínica desprendida del complejo luceferina-luciferasa como marcador de la actividad transcripcional y como normalizador se utilizó la actividad beta-galactosidasa.

Los resultados obtenidos estuvieron comprendidos dentro de lo esperado, puesto que se correlacionaron, en lo general, con lo observado por las técnicas de *Western blot* y qRT-PCR. Las construcciones para *Nis*, *Tg*, *Tpo*, *Duox1* demostraron una disminución de la actividad enzimática en función de la dosis aplicada. Por el contrario, *Pds* demuestra una leve tendencia a incrementar su actividad promotora tornándose en un aumento significativo a la dosis más alta del iodolípido. Por último, sobre el constructo de *Duox2* se pudo observar un aumento de la actividad transcripcional a la dosis más baja y una disminución muy pronunciada a la más alta.

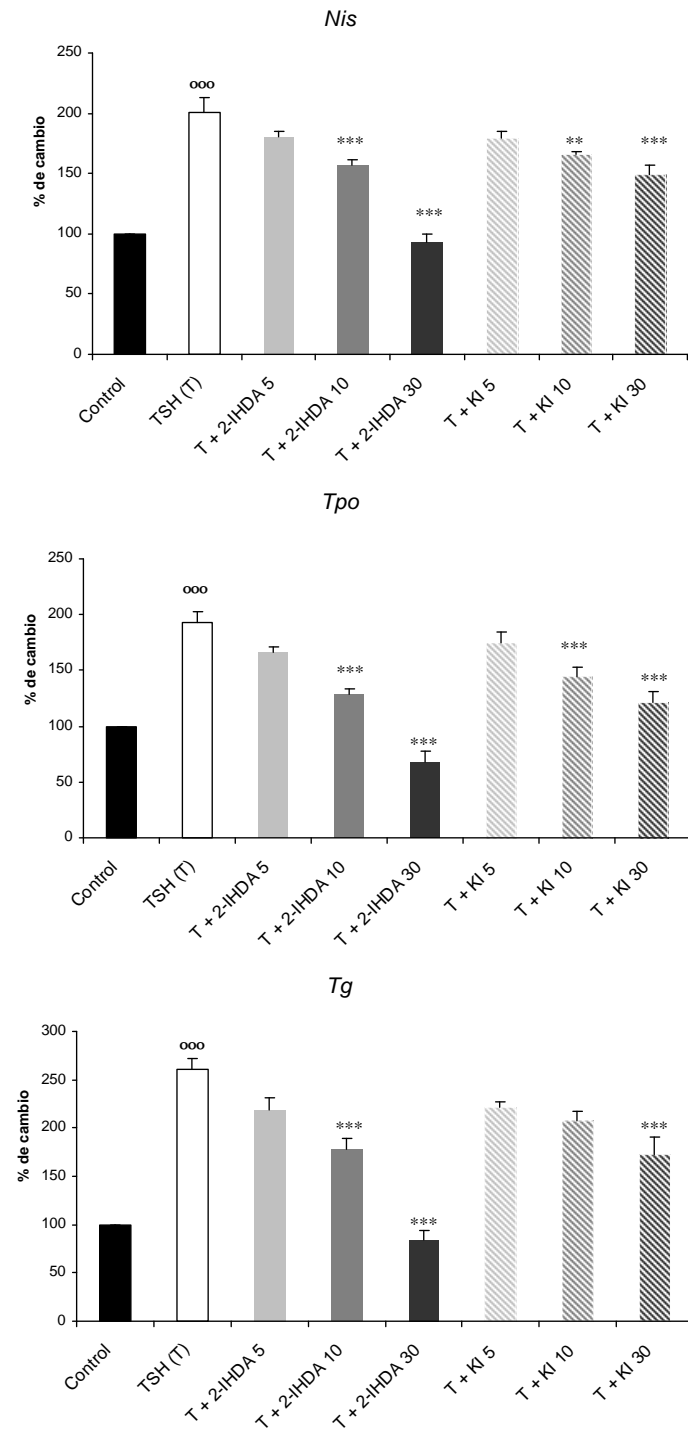
Con respecto a las construcciones de los factores de transcripción *Pax8* y *Foxe1* se observó una disminución de la actividad a nivel transcripcional en función de la dosis ensayada. *Nkx2-1* por el contrario, denotó una disminución en su actividad transcripcional bajo el efecto de la TSH, la cual fue revertida por el iodolípido y el KI.

	<i>Nis</i>	<i>Tpo</i>	<i>Tg</i>
Control	100,00	100,00	100,00
TSH (T)	201,21 ± 11,47 <sup>000</sup>	193,05 ± 9,07 <sup>000</sup>	261,10 ± 11,23 <sup>000</sup>
T + 2-IHD 5	180,48 ± 4,02	166,02 ± 5,02	219,32 ± 12,27
T + 2-IHD 10	157,34 ± 4,63 <sup>***</sup>	128,96 ± 4,63 <sup>***</sup>	177,81 ± 11,49 <sup>***</sup>
T + 2-IHD 30	93,16 ± 7,04 <sup>***</sup>	67,57 ± 9,65 <sup>***</sup>	84,33 ± 9,92 <sup>***</sup>
T + KI 5	179,68 ± 4,83	174,90 ± 10,04	221,15 ± 6,01
T + KI 10	165,39 ± 3,02 <sup>**</sup>	144,40 ± 8,30 <sup>***</sup>	206,79 ± 10,18
T + KI 30	149,50 ± 7,85 <sup>***</sup>	121,43 ± 9,07 <sup>***</sup>	173,11 ± 18,02 <sup>***</sup>

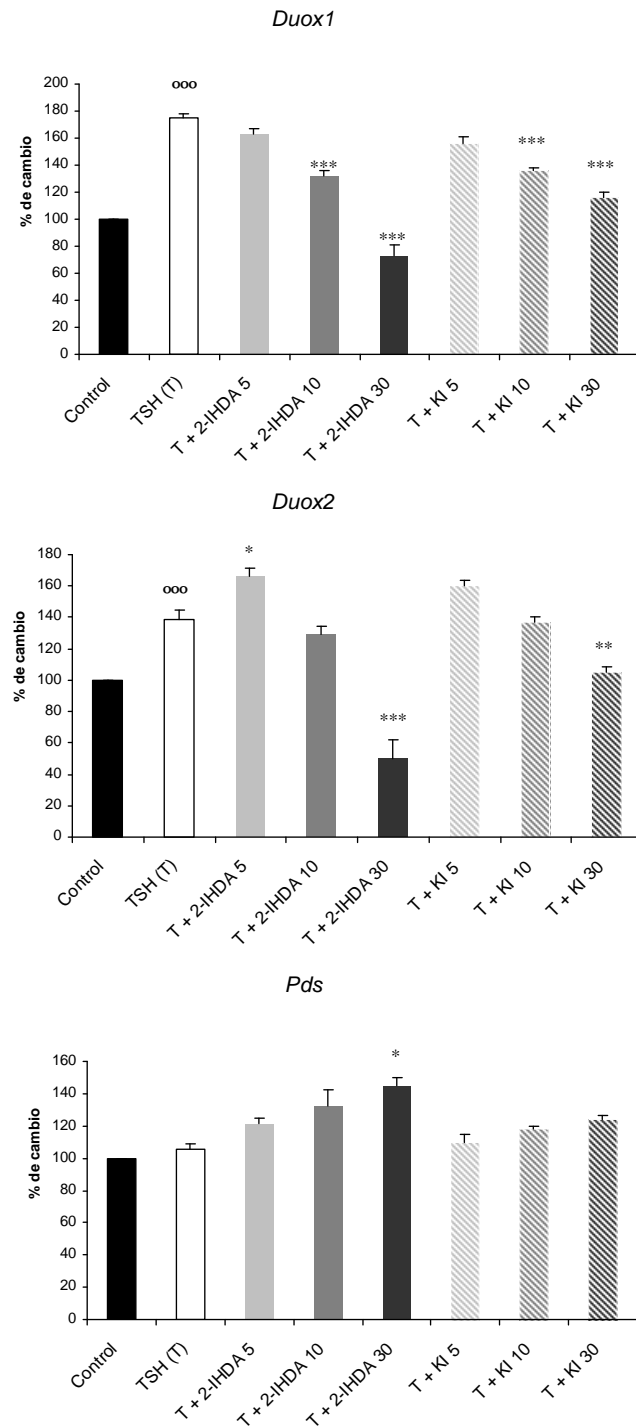
	<i>Duox1</i>	<i>Duox2</i>	<i>Pds</i>
Control	100,00	100,00	100,00
TSH (T)	174,83 ± 3,67 <sup>000</sup>	138,89 ± 5,56 <sup>000</sup>	105,70 ± 3,42
T + 2-IHD 5	163,64 ± 3,85	166,39 ± 5,00 <sup>*</sup>	121,07 ± 3,84
T + 2-IHD 10	131,64 ± 4,20 <sup>***</sup>	129,17 ± 5,14	132,62 ± 10,03
T + 2-IHD 30	73,25 ± 8,22 <sup>***</sup>	50,00 ± 12,08 <sup>***</sup>	144,75 ± 5,31 <sup>*</sup>
T + KI 5	156,12 ± 5,24	160,14 ± 3,75	109,36 ± 5,07
T + KI 10	136,01 ± 1,92 <sup>***</sup>	137,22 ± 2,92	117,87 ± 2,19
T + KI 30	115,73 ± 4,20 <sup>***</sup>	105,28 ± 3,61 <sup>**</sup>	123,90 ± 2,53

	<i>Pax8</i>	<i>Nkx2-1</i>	<i>Foxe1</i>
Control	100,00	100,00	100,00
TSH (T)	153,85 ± 2,92 <sup>000</sup>	76,92 ± 1,92 <sup>000</sup>	263,16 ± 16,32 <sup>000</sup>
T + 2-IHD 5	123,23 ± 5,08 <sup>***</sup>	86,54 ± 2,62 <sup>*</sup>	238,16 ± 8,42
T + 2-IHD 10	101,08 ± 3,54 <sup>***</sup>	95,69 ± 1,85 <sup>***</sup>	195,26 ± 5,79 <sup>***</sup>
T + 2-IHD 30	84,00 ± 3,08 <sup>***</sup>	109,69 ± 2,77 <sup>***</sup>	32,37 ± 10,26 <sup>***</sup>
T + KI 5	130,00 ± 7,54 <sup>***</sup>	88,92 ± 2,46 <sup>**</sup>	241,58 ± 9,74
T + KI 10	115,38 ± 4,92 <sup>***</sup>	89,62 ± 1,46 <sup>**</sup>	211,32 ± 3,42 <sup>*</sup>
T + KI 30	107,23 ± 4,46 <sup>***</sup>	95,54 ± 4,15 <sup>***</sup>	196,58 ± 5,00 <sup>***</sup>

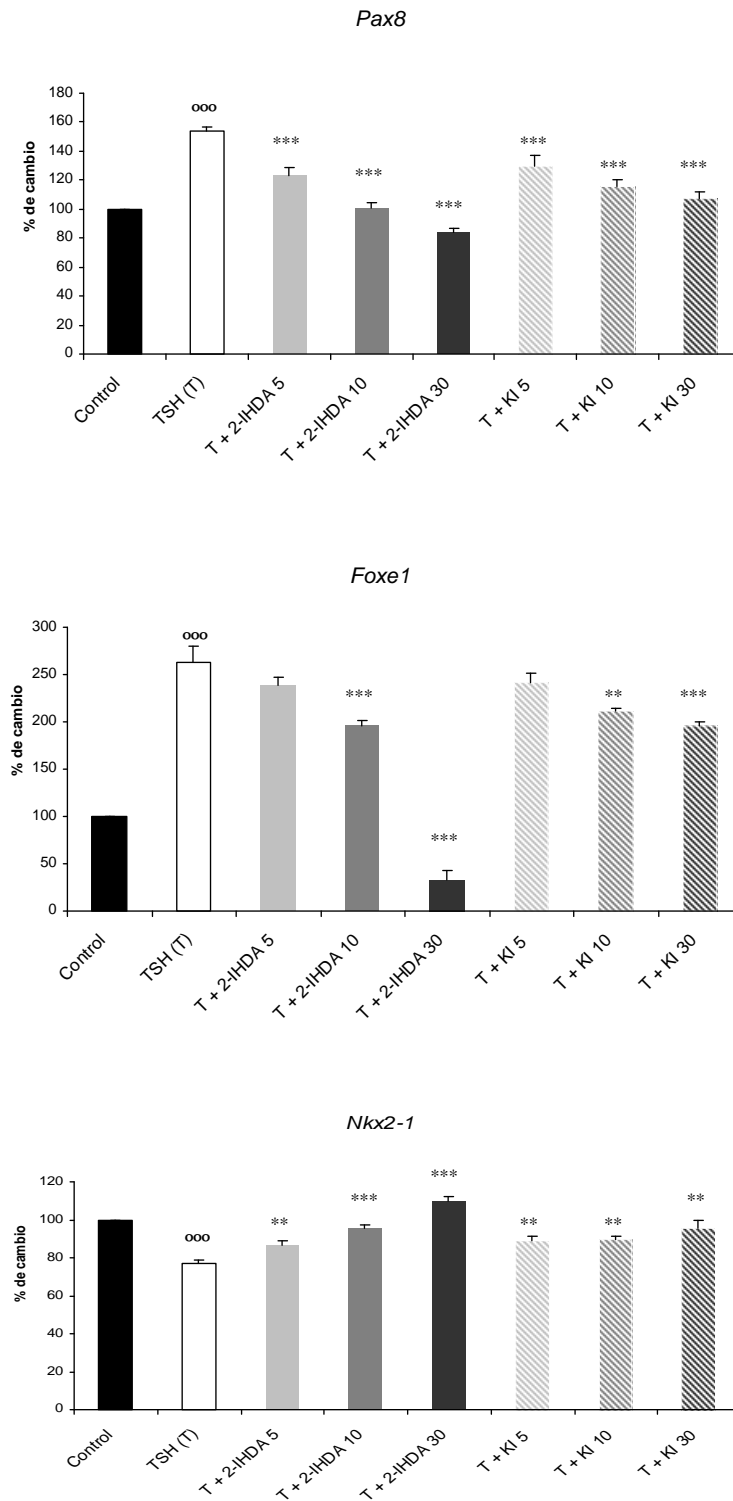
**Tabla 18:** Efecto ejercido por diferentes concentraciones de KI y 2-IHDA sobre células FRTL-5, que fueron transfectadas de manera transiente con diferentes regiones promotoras acopladas al gen de luciferasa (Luc) -utilizado como reportero. La actividad Luc se analizó luego de 24 h y se normalizó por  $\beta$ -galactosidasa. Cada valor es el resultado de 4-6 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo. <sup>000</sup>p < 0,001; <sup>00</sup>p < 0,01; <sup>0</sup>p < 0,05 vs. Control; <sup>\*\*\*</sup>p < 0,001; <sup>\*\*</sup>p < 0,01; <sup>\*</sup>p < 0,05 vs. TSH.



**Figura 24-a:** Efecto ejercido por diferentes concentraciones de KI y 2-IHDA sobre las regiones promotoras de los genes *Nis* (a), *Tpo* (b) y *Tg*(c) en células FRTL-5, que fueron transfectadas de manera transiente. La actividad Luc se analizó luego de 24 h de tratamiento y se normalizó por  $\beta$ -galactosidasa. Cada valor es el resultado de 4-6 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo.  $^{ooo}p < 0,001$ ;  $^{oo}p < 0,01$ ;  $^o p < 0,05$  vs. Control;  $^{***}p < 0,001$ ;  $^{**}p < 0,01$ ;  $^*p < 0,05$  vs. TSH.



**Figura 24-b:** Efecto ejercido por diferentes concentraciones de KI y 2-IHDA sobre las regiones promotoras de los genes *Duox1* (a), *Duox2* (b) y *Pds*(c) en células FRTL-5, que fueron transfectadas de manera transiente. La actividad Luc se analizó luego de 24 h de tratamiento y se normalizó por -galactosidasa. Cada valor es el resultado de 4-6 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo. <sup>ooo</sup>p < 0,001; <sup>oo</sup>p < 0,01; <sup>o</sup>p < 0,05 vs. Control; <sup>\*\*\*</sup>p < 0,001; <sup>\*\*</sup>p < 0,01; <sup>\*</sup>p < 0,05 vs. TSH.



**Figura 24-c:** Efecto ejercido por diferentes concentraciones de KI y 2-IHDA sobre las regiones promotoras de los genes *Pax8* (a), *Foxe1* (b) y *Nkx2-1*(c) en células FRTL-5, que fueron transfectadas de manera transiente. La actividad Luc se analizó luego de 24 h de tratamiento y se normalizó por -galactosidasa. Cada valor es el resultado de 4-6 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  vs. Control; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  vs. TSH.

9) Estudio de la interacción de los factores de transcripción PAX8, NKX2-1 y FOXE1 con el DNA de genes tiroideos.

Considerando los resultados obtenidos a nivel de actividad luciferasa de las regiones promotoras, donde se demostró el efecto del 2-IHDA sobre los genes ensayados, se propuso estudiar posibles cambios en la interacción de los factores de transcripción (PAX8, NKX2-1 y FOXE1) con el DNA de los sitios descritos para *Nis*, *Tpo*, *Tg*, *Duox2* y *Cns87* (Tabla 19 y Figuras 25 a, b y c).

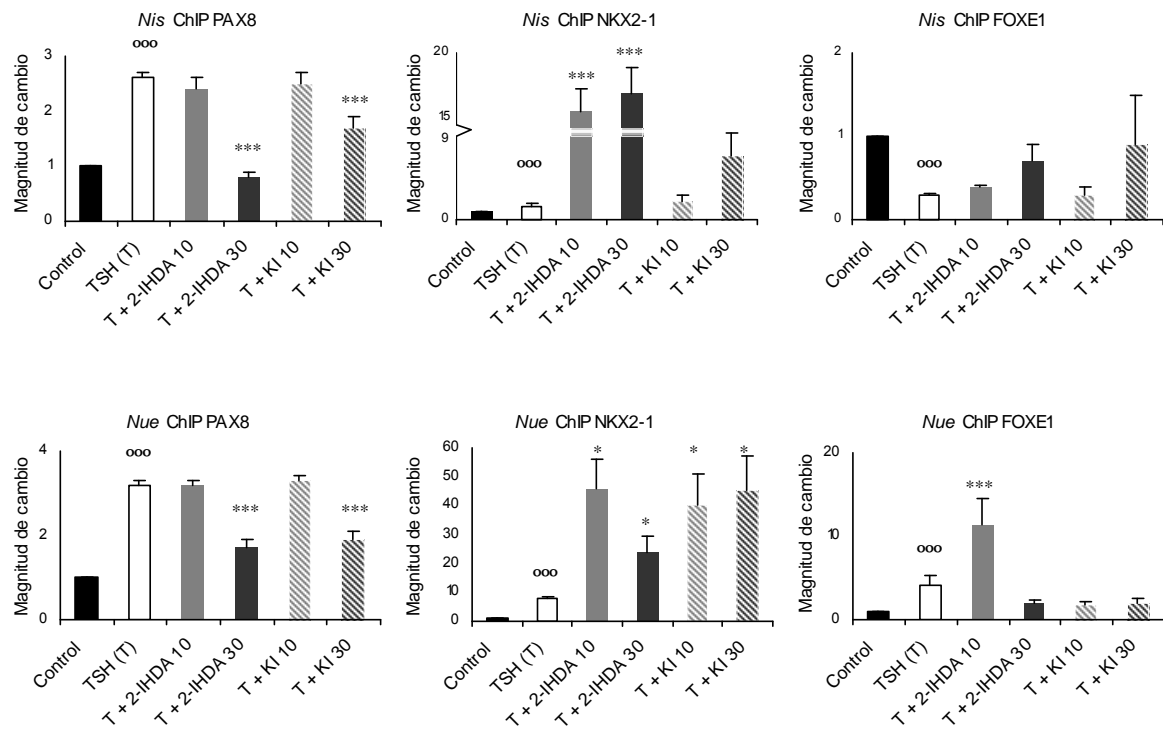
El resultado obtenido por la técnica de ChIP permitió observar que el 2-IHDA promueve una disminución significativa de la interacción de PAX8 con el DNA en las regiones promotoras de *Nis*, *Tg* y *Tpo* como así también sobre el potenciador de *Nis*. Por el contrario, el iodolípido y el halógeno incrementaron la actividad de NKX2-1 a las dosis ensayadas. Estos resultados permiten observar que ambos factores de transcripción poseen una relación directa entre el nivel de RNAm, cantidad de proteína observada y cuantificación de la interacción con el DNA.

El factor FOXE1 se vió estimulado de manera significativa en su interacción con las regiones promotoras de *Tg* y *Tpo* a la dosis más alta y en menor medida sobre *Nis*. Con respecto a *Duox2* se analizó el sitio descrito por Fernández et al., (2015) y se determinó una disminución en la asociación del factor a la dosis más baja y un pronunciado y significativo aumento a la dosis más alta. El KI en todos los casos posee un efecto de igual sentido pero menor magnitud.

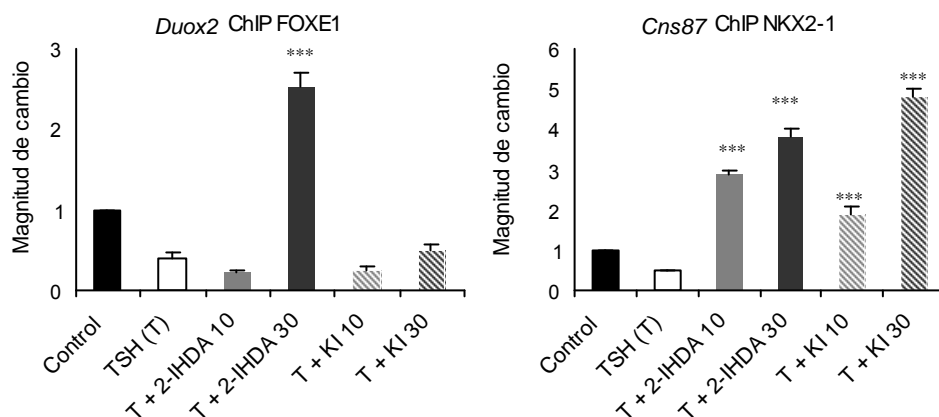


Factor de transcripción	Tratamiento	Promotor					
		<i>Nis Proximal</i>	<i>Nue</i>	<i>Tpo</i>	<i>Tg</i>	<i>Duox2</i>	<i>Cns87</i>
PAX8	Control	1	1	1	1		
	TSH (T)	2,6 ± 0,1 <sup>000</sup>	3,2 ± 0,1 <sup>000</sup>	3,7 ± 0,1 <sup>000</sup>	4,6 ± 0,2 <sup>000</sup>		
	T + 2-IHDA 10	2,4 ± 0,2	3,2 ± 0,1	1,9 ± 0,2 <sup>***</sup>	2,5 ± 0,1 <sup>***</sup>		
	T + 2-IHDA 30	0,8 ± 0,1 <sup>***</sup>	1,7 ± 0,2 <sup>***</sup>	1,1 ± 0,1 <sup>***</sup>	2,4 ± 0,2 <sup>***</sup>		
	T + KI 10	2,5 ± 0,2	3,3 ± 0,1	3,1 ± 0,2 <sup>*</sup>	3,1 ± 0,1 <sup>**</sup>		
	T + KI 30	1,7 ± 0,2 <sup>***</sup>	1,9 ± 0,2 <sup>***</sup>	3,0 ± 0,3 <sup>*</sup>	2,1 ± 0,2 <sup>***</sup>		
NKX2-1	Control	1	1	1	1		1
	TSH (T)	1,7 ± 0,5	8,0 ± 0,7 <sup>000</sup>	2,9 ± 1,3	1,4 ± 0,3		0,5 ± 0,01
	T + 2-IHDA 10	16,0 ± 3,2 <sup>***</sup>	46,1 ± 10,1 <sup>*</sup>	3,2 ± 0,4	4,5 ± 0,5 <sup>*</sup>		2,9 ± 0,1 <sup>***</sup>
	T + 2-IHDA 30	18,5 ± 3,3 <sup>***</sup>	23,7 ± 5,6 <sup>*</sup>	22,7 ± 4,0 <sup>***</sup>	4,9 ± 1,5 <sup>*</sup>		3,8 ± 0,2 <sup>***</sup>
	T + KI 10	2,4 ± 0,8	40,1 ± 11,1 <sup>*</sup>	2,3 ± 0,6	2,1 ± 0,6		1,9 ± 0,2 <sup>***</sup>
	T + KI 30	8,4 ± 3,0	45,2 ± 11,8 <sup>*</sup>	7,7 ± 2,3	5,2 ± 0,6 <sup>**</sup>		4,8 ± 0,2 <sup>***</sup>
FOXE1	Control	1	1	1	1	1	
	TSH (T)	0,3 ± 0,0 <sup>000</sup>	4,2 ± 1,0 <sup>000</sup>	1,9 ± 0,2	2,5 ± 0,4	0,39 ± 0,07 <sup>000</sup>	
	T + 2-IHDA 10	0,4 ± 0,0	11,3 ± 3,2 <sup>***</sup>	3,7 ± 1,2	6,5 ± 0,6	0,22 ± 0,04	
	T + 2-IHDA 30	0,7 ± 0,2	2,0 ± 0,4	32,7 ± 7,9 <sup>***</sup>	13,4 ± 3,5 <sup>***</sup>	2,53 ± 0,17 <sup>***</sup>	
	T + KI 10	0,3 ± 0,1	1,8 ± 0,3	2,8 ± 1,0	2,7 ± 0,4	0,26 ± 0,03	
	T + KI 30	0,9 ± 0,6	2,0 ± 0,6	2,3 ± 0,4	4,3 ± 0,4	0,49 ± 0,08	

**Tabla 19:** Efecto ejercido por diferentes concentraciones de KI y 2-IHDA sobre la interacción de los factores de transcripción PAX8, NKX2-1 y FOXE1 sobre las regiones promotoras de los genes *Nis* y su potenciador *Nue*, *Tg*, *Tpo*, *Duox2* y *Cns87* en células FRTL-5. Los resultados se obtuvieron luego de 24 h de tratamiento mediante la aplicación de la técnica de ChIP y posterior análisis por PCR en tiempo real. Cada valor es el resultado de 4-5 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media ± ESM de cada grupo. <sup>000</sup>p < 0,001; <sup>00</sup>p < 0,01; <sup>0</sup>p < 0,05 vs. Control; <sup>\*\*\*</sup>p < 0,001; <sup>\*\*</sup>p < 0,01; <sup>\*</sup>p < 0,05 vs. TSH.



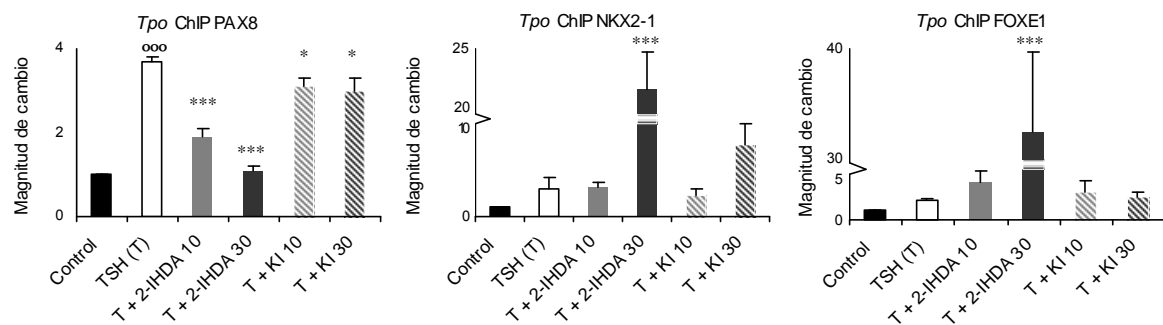
**Figura 25-a:** Efecto ejercido por diferentes concentraciones de KI y 2-IHDA sobre la interacción de PAX8, NKX2-1 y FOXE1 con el DNA de la región promotora proximal del gen *Nis* y su potenciador *Nue* en células FRTL-5. Los resultados se obtuvieron luego de 24 h de tratamiento mediante la aplicación de la técnica de ChIP y posterior análisis por PCR en tiempo real. Cada valor es el resultado de 4-5 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo. <sup>ooo</sup>p < 0,001; <sup>oo</sup>p < 0,01; <sup>o</sup>p < 0,05 vs. Control; <sup>\*\*\*</sup>p < 0,001; <sup>\*\*</sup>p < 0,01; vs. TSH; <sup>\*</sup>p < 0,05 vs. TSH.



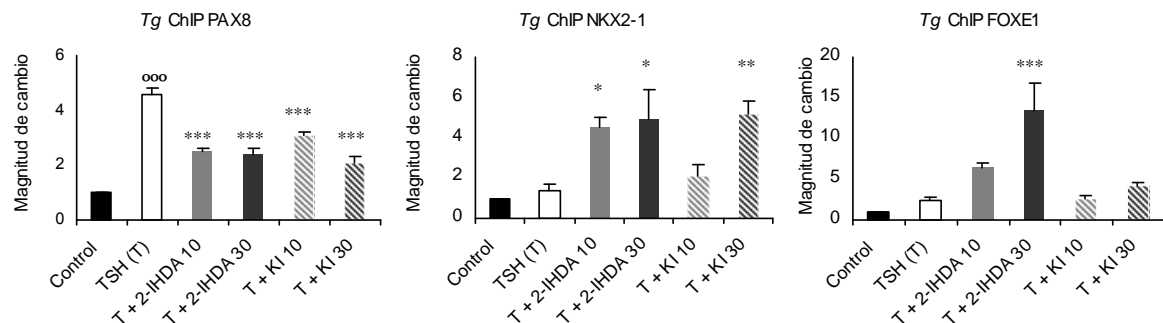
**Figura 25-b:** Efecto ejercido por diferentes concentraciones de KI y 2-IHDA sobre la interacción de FOXE1 con el DNA de la región promotora proximal del gen *Duox2* (izq.) y sobre la interacción de NKX2-1 con el DNA de la región promotora proximal del gen *Cns87* (der.).

NKX2-1 con el DNA de la región potenciadora de *Pax8* (der.) en células FRTL-5. Los resultados se obtuvieron luego de 24 h de tratamiento mediante la aplicación de la técnica de ChIP y posterior análisis por PCR en tiempo real. Cada valor es el resultado de 4-5 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo.  $^{ooo}p < 0,001$ ;  $^{oo}p < 0,01$ ;  $^op < 0,05$  vs. Control;  $^{***}p < 0,001$ ;  $^{**}p < 0,01$ ;  $^*p < 0,05$  vs. TSH.

A



B



**Figura 25-c:** Efecto ejercido por diferentes concentraciones de KI y 2-IHDA sobre la interacción de PAX8, NKX2-1 y FOXE1 con el DNA de la región promotora proximal de *Tpo* (A) y *Tg* (B) en células FRTL-5. Los resultados se obtuvieron luego de 24 h de tratamiento mediante la aplicación de la técnica de ChIP y posterior análisis por PCR en tiempo real. Cada valor es el resultado de 4-5 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo.  $^{ooo}p < 0,001$ ;  $^{oo}p < 0,01$ ;  $^op < 0,05$  vs. Control;  $^{***}p < 0,001$ ;  $^{**}p < 0,01$ ; vs. TSH;  $^*p < 0,05$  vs. TSH.

#### **D) Estudio de la acción del 2-IHDA sobre la modulación de los PPARs y su efecto en genes tiroideos.**

Los PPARs como ya se ha mencionado, son miembros de la superfamilia de receptores nucleares y existen tres subtipos: alfa (  $\alpha$  ); beta (  $\beta$  ) y gamma (  $\gamma$  ). Se han identificado distintos ligandos endógenos para PPAR alfa y gamma. El subtipo alfa puede interaccionar con ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido araquidónico y eicosapentanoico. Por su parte, el subtipo gamma puede interaccionar con ácido linoleico, ácido araquidónico y prostaglandinas (Kota et al 2004). Por consiguiente, teniendo en cuenta la estructura molecular del 2-IHDA y sus posibles conformaciones tridimensionales junto con los resultados publicados por Nuñez Anita et al (2009) y Nava-Villalba et al (2015), se propuso estudiar la posibilidad de modulación del 2-IHDA sobre estos receptores nucleares y su incidencia en la expresión de los genes estudiados.

##### **1) Análisis de activación de los PPARs por el 2-IHDA**

A fin de estudiar si los PPARs son modulados en su actividad por el 2-IHDA, se transfectó un plásmido reportero conteniendo tres secuencias consenso de respuesta a los PPARs (PPER X3- TK Luc publicado por Forman et al., 1995). Como control de inducción de la activación de estos factores de transcripción se utilizaron agonistas específicos. Los resultados obtenidos permitieron determinar que el 2-IHDA promueve la activación de los PPARs de manera dosis dependiente. También se determinó que en medio 5H, es decir en ausencia de TSH en el medio, estos factores nucleares se mantienen activos (Tabla 20).

Tratamiento	%
Control	100,00
TSH (T)	42,52 $\pm$ 7,99 <sup>000</sup>
T + 2-IHDA 10	66,33 $\pm$ 4,03 <sup>**</sup>
T + 2-IHDA 30	86,80 $\pm$ 7,08 <sup>***</sup>
T + Fenofibrato 10	90,29 $\pm$ 4,03 <sup>***</sup>
T + Fenofibrato 30	101,07 $\pm$ 7,18 <sup>***</sup>
T + Rosiglitazona 10	88,94 $\pm$ 5,88 <sup>***</sup>
T + Rosiglitazona 30	103,96 $\pm$ 11,8 <sup>***</sup>

**Tabla 20:** Efecto ejercido por diferentes concentraciones de 2-IHDA y agonistas específicos (fenofibrato  $\rightarrow$  PPAR alfa y rosiglitazona maleato  $\rightarrow$  PPAR gamma) sobre el constructo reportero de la actividad de los PPARs en células FRTL-5. El constructo posee tres elementos de respuesta a PPARs asociados al promotor de *Thimidine Kinase* unidos al gen Luc. El valor obtenido para cada tratamiento se normalizó por -galactosidasa. Cada valor es el resultado de 4-5 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado cuantificado como porcentaje en función del control. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo. <sup>000</sup>p < 0,001; <sup>00</sup>p < 0,01; <sup>0</sup>p < 0,05 vs. Control; <sup>\*\*\*</sup>p < 0,001; <sup>\*\*</sup>p < 0,01; <sup>\*</sup>p < 0,05 vs. TSH.

De acuerdo a los resultados obtenidos y observando que el 2-IHDA posee la capacidad de modular de manera positiva la activación de esta familia de receptores nucleares, se determinó mediante construcciones quiméricas cuál de los tres subtipos era activado y en qué magnitud. Se determinó que los subtipos alfa y gamma son modulados de manera positiva (Tabla 21). Por el contrario el subtipo beta (o también llamado delta) demostró un comportamiento indiferente a los tratamientos ensayados (resultados no mostrados).

De los datos obtenidos se determinó que el iodolípido en estudio posee una mayor y significativa afinidad por el PPAR alfa vs. PPAR gamma (2-IHD30 = 183,71 vs. 104,38). A su vez, el 2-IHDA comparado con el agonista del subtipo alfa, posee un mayor poder de activación aunque no significativo.

Tratamiento	PPAR alfa	PPAR gamma
Control	100	100
TSH (T)	66,07 ± 2,81 <sup>000</sup>	71,45 ± 3,12 <sup>00</sup>
T + 2-IHDA 10	141,02 ± 3,53 <sup>***</sup>	102,98 ± 6,30
T + 2-IHDA 30	183,71 ± 5,54 <sup>***</sup>	104,38 ± 4,28 <sup>*</sup>
T + Fenofibrato 10	139,34 ± 11,85 <sup>***</sup>	114,39 ± 4,48 <sup>*</sup>
T + Fenofibrato 30	159,07 ± 19,85 <sup>***</sup>	121,97 ± 4,5 <sup>*</sup>
T + Rosiglitazona 10	73,68 ± 5,32	1031,79 ± 112,58 <sup>***</sup>
T + Rosiglitazona 30	75,06 ± 3,97	992,62 ± 83,05 <sup>***</sup>

**Tabla 21:** Efecto ejercido por diferentes concentraciones de 2-IHDA y agonistas específicos sobre construcciones quiméricas reporteras de la actividad específica de cada uno de los PPARs. Células FRTL-5 fueron transfectadas de manera transciende y tratadas durante 24h. Los constructos son una quimera de PPAR alfa, beta o gamma unidos a Gal4 que otorgan señal al activarse e interaccionar con un segundo plásmido que posee elementos de respuesta para gal 4 fusionados al gen Luc. El valor obtenido para cada tratamiento se normalizó por  $\beta$ -galactosidasa. Cada valor es el resultado de 4-5 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo. <sup>000</sup>p< 0,001 vs. Control; <sup>\*\*\*</sup>p< 0,001; <sup>\*\*</sup>p< 0,01 y <sup>\*</sup>p< 0,05 vs. TSH.

Los datos obtenidos confirman que el fenofibrato presenta una alta y significativa afinidad por el PPAR alfa aunque algo menor que la demostrada por el 2-IHDA para las mismas concentraciones. Su efecto sobre PPAR gamma es mayor que la del iodolípido pero no en grado significativo al compararlo con TSH. Por otra parte la rosiglitazona maleato posee una muy alta y específica afinidad por el PPAR gamma, mas no por el subtipo alfa.

## 2) Definición y estudio de los sitios putativos de interacción entre los PPARs y el DNA de las regiones promotoras de genes tiroideos.

Los datos obtenidos a partir de las transfecciones realizadas permitieron observar la activación de estos factores nucleares. Por consiguiente, se procedió

a realizar una búsqueda de sitios putativos de interacción entre estos factores y el DNA de regiones promotoras de los genes de *Nis*, *Tg*, *Tpo*, *Pax8*, *Nkx2-1* y *Foxe1*.

## 2.1 Análisis informático de los potenciales sitios de interacción de PPARα y PPARγ sobre secuencias contiguo de genes tiroideos.

Las secuencias cóntigo de DNA en dirección 5'-3' a partir del sitio ATG para los genes *Nis*, *Tg*, *Tpo*, *Pax8*, *Nkx2-1* y *Foxe1*, fueron analizadas con la aplicación PROMO 3.0 y el resultado obtenido demostró que existen sitios putativos de interacción para los genes en cuestión (Tabla 22)

Gen	Factor de Transcripción	Secuencia 5'-3'	Posición del ATG
<i>Nis</i>	PPAR gamma	TGACCACTGCC	-2781 bp
	PPAR alfa	GGGACCTTGAGC	-1869 bp
	PPAR alfa	ATCATAGGTCCA	-593 bp
	PPAR gamma	AGAAAGGGTCA	-266 bp
<i>Tpo</i>	PPAR gamma	GGGGAGGGTCA	-887 bp
	PPAR gamma	TGACCACTTGT	-618 bp
<i>Tg</i>	PPAR gamma	TGGAGTGGTCA	-220 bp
<i>Pax8</i>	PPAR gamma	TGACCTTCCTC	- 84,4 Kb
	PPAR alfa	CTGACCTTCCTC	
<i>Foxe1</i>	PPAR alfa	GGGAAAGGTCTC	-1812 bp
	PPAR alfa	AACCGAGGTCAA	-1794 bp
	PPAR gamma	AACCGAGGTCA	-1795 bp
	PPAR gamma	GCCAGTGGTCA	-1736 bp
<i>Nkx2-1</i>	PPAR alfa	CAGCCCCAGGG	-884 bp
	PPAR alfa	GACTGGGGCTC	-840 bp

**Tabla 22:** Sitios putativos de unión de los PPARs al DNA de regiones promotoras y sus posiciones relativas al codón de inicio de transducción ATG obtenidos a partir del análisis de secuencias contiguo de *Rattus norvegicus*, con la aplicación PROMO 3.0.

Mediante la utilización del *software* mencionado se ha podido identificar cuatro sitios de unión de PPARs a la región promotora del gen *Nis*. La más alejada del sitio

ATG, se ubica a -2781 pares de bases y corresponde a PPAR gamma, la segunda y la tercera corresponden a PPAR alfa y se encuentran a -1869 bp y - 593 bp respectivamente. El cuarto sitio corresponde al subtipo gamma y es el más próximo por ubicarse a -266 bp del ATG. Los sitios -2781 y -1869 poseen la particularidad de flanquear el potenciador de *Nis* en rata, mientras que el sitio -266 se ubica directamente dentro de la región promotora proximal.

La alineación del DNA de rata con el DNA humano permitió determinar que el sitio gamma -2781 posee una homología del 82% (9/11) y se encuentra dentro de un dominio conservado de 63 bp como se detalla a continuación:

5' -> 3'

CACAACATGTACCGAGAGTACCGGGACCTGACCACTGCCGGCGCGGTCACACAGTGCTGTGAG	- 2747 rata
CACAACATGTACCGGGAATACCGGGACCTGACCACCGCAGGCGCTGTCACCCAGTGCTGTAAG	-10095 hum

Por otra parte, los sitios alfa-1869 (GGGACCTTGAGC) y alfa-593 (ATCATAGGTCCA) se encuentran conservados con una homología del 82% (9/11bp) en los sitios -909 y -1979 respectivamente. De estos datos se interpreta que los sitios se encuentran invertidos en su disposición al comparar humanos respecto de ratas. El sitio gamma-266 (AGAAAGGGTCA) fue identificado con una homología de 8/11bp a -463bp de ATG.

En ratas *Tpo* presenta solo dos sitios de unión para el subtipo gamma, los cuales están próximos entre si y se encuentran a - 887 bp (GGGGAGGGTCA) y - 618 bp (TGACCACTTGT) ambos se encuentran conservados con una homología de 8/11bp y en humanos se ubican a -212bp y -622bp respectivamente. Nuevamente se observó que la disposición de los sitios es inversa a la observada en ratas.



*Tg* presenta un solo sitio de unión en ratas y es para PPAR $\gamma$  y se ubica directamente dentro de la región promotora proximal a -220 bp (GGAGGTGGTCA). En humanos su sitio se ubica a -2811 bp del ATG y con una correspondencia de 7/10 bp.

*Pax8* posee dentro de lo que se ha definido como su potenciador – conservado evolutivamente a través de muchas especies- ubicado a 84,4 kb del ATG corriente arriba, un sitio de unión para PPAR $\alpha$  (CTGACCTTCCTC) y PPAR $\gamma$  (TGACCTTCCTC) en lo que Nitsch et al (2010) definieron como sitio protegido cinco (FT V) en su ensayo de *foot printing*. El sitio de unión para ambos PPARs se superpone uno con el otro y varían en su secuencia solo en una base tal como se puede apreciar en la Tabla 22.

*Foxe1* posee cuatro sitios putativos de unión para los PPARs. Dos para PPAR $\alpha$  y dos para PPAR $\gamma$ . Es de hacer notar que los cuatro posibles secuencias de unión se ubican dentro de una extensión de 76 bases. Hacia el extremo más distal (-1812 bp del ATG), se ubica un sitio alfa y en sentido proximal se ubica un sitio gamma (-1736 bp del ATG); en medio de ellos se ubican superpuestos un sitio alfa (-1794 bp) con uno gamma (-1795 bp) tal como ocurre en CNS87.

El sitio alfa -1812bp se encuentra en humanos a -1703bp con una correspondencia de 8/11 bp; el sitio gamma-1736 se lo encuentra a -1928 también con una homología de 8/11 bp. En cambio el sitio -1794 de PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  se encuentra mucho más distante a -3217bp del ATG.

*Nkx2-1* posee dos sitios para PPAR alfa ubicados muy próximos entre si a -884bp (CAGCCCCAGGG) y -840bp (GACTGGGGCTC) del codón de inicio ATG.

Ambos se encuentran conservados casi en exacta disposición pero a -506bp y -446bp en humanos y con una homología de 9/11 bp.

## 2.2 Análisis de los sitios putativos de acción de los PPARs, por ChIP- PCR en tiempo real

Obtenido el resultado del análisis realizado por el *software* PROMO 3.0 se procedió a diseñar cebadores que flanquearan los sitios descritos. Cabe destacar que la técnica de ChIP permite discriminar sitios de unión para un mismo factor de transcripción que se encuentren a más de 250 bp de distancia. Para aquellos que no cumplen con este requisito es muy difícil poder discriminar un sitio respecto de otro.

Para Nis se diseñaron cuatro pares de cebadores y se procedió al análisis por inmunoprecipitación de cromatina y posterior cuantificación por PCR en tiempo real. Los datos obtenidos permitieron determinar que uno de los cuatro sitios previamente identificados, el sitio gamma – 266, no posee actividad debido a que no se observó señal en ninguno de los ensayos realizados.

Factor de transcripción	Tratamiento	Sitios en <i>Nis</i>	
		Alfa -1869	Alfa -593
PPAR alfa	Control	1	1
	TSH (T)	0,45 ± 0,01 <sup>ooo</sup>	0,47 ± 0,11 <sup>ooo</sup>
	T + 2-IHDA 10	1,18 ± 0,11 <sup>***</sup>	0,74 ± 0,13
	T + 2-IHDA 30	2,02 ± 0,10 <sup>***</sup>	3,59 ± 0,24 <sup>***</sup>
	T + siRNA PPARα + 2-IHDA 30	0,70 ± 0,16 <sup>aaa</sup>	8,87 ± 1,08 <sup>*** aaa</sup>
	T + siRNA PPARγ + 2-IHDA 30	1,90 ± 0,19 <sup>***</sup>	3,27 ± 0,42 <sup>***</sup>
		<b>Gamma - 2781</b>	<b>Gamma – 266</b>
PPAR gamma	Control	1	X
	TSH (T)	0,19 ± 0,05 <sup>ooo</sup>	X
	T + 2-IHDA 10	0,43 ± 0,08 <sup>**</sup>	X
	T + 2-IHDA 30	0,74 ± 0,02 <sup>***</sup>	X
	T + siRNA PPARα + 2-IHDA 30	0,61 ± 0,04 <sup>***</sup>	X
	T + siRNA PPARγ + 2-IHDA 30	0,14 ± 0,02 <sup>aaa</sup>	X

**Tabla 23:** Análisis por ChIP y qPCR del efecto ejercido por diferentes dosis de 2-IHDA y la acción de los siRNAs específicos para cada subtipo de PPAR sobre la asociación del factor de transcripción PPAR alfa / gamma y los sitios identificados dentro de la secuencia contiguo de *Nis* en células FRTL-5. El nombre de los sitios alude a la ubicación de la secuencia blanco de los PPARs en relación al codón ATG. Los tratamientos se realizaron durante 24h. Cada valor es el resultado de 4-5 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media ± ESM de cada grupo. <sup>ooo</sup>p< 0,001 vs. Control; <sup>\*\*\*</sup>p< 0,001; <sup>\*\*</sup>p< 0,01 y <sup>\*</sup>p< 0,05 vs. TSH; <sup>aaa</sup>p<0,001 vs. T + 2-IHDA 30.

Como se puede apreciar en la Tabla 23 cuando se aplica el iodolípido se observa un aumento en la interacción entre los subtipos de los factores transcripcionales y los sitios alfa -1869, gamma-2781 y alfa -593.

Cuando se adicionó el RNA de interferencia diseñado para de cada subtipo el análisis de los sitios permitió observar lo esperado en los sitios gamma-2781 y alfa-1869. En consecuencia, el siRNA para PPAR alfa promueve una disminución de la asociación entre el factor de transcripción y el sitio alfa-1869. Del mismo modo actúa el siRNA para PPAR gamma en el sitio gamma-2781. Por el contrario la aplicación del siRNA alfa ejerce sobre el sitio alfa-593 un efecto contrapuesto al esperado, donde se observó un aumento significativo respecto de la acción del 2-IHDA.

El estudio realizado sobre la región promotora de *Tpo* permitió determinar que el 2-IHDA promueve un incremento en la interacción del PPAR gamma con los sitios definidos, siendo más sensible a la acción del iodolípido el sitio gamma-887; mientras que la adición del siRNA correspondiente al subtipo gamma disminuyó significativamente la acción del iodolípido. El siRNA alfa no generó interferencia. En *Tg* datos similares fueron obtenidos para el sitio gamma-220 (Tabla 24).

Factor de transcripción	Tratamiento	Sitios en <i>Tpo</i>		Sitio en <i>Tg</i>
		Gamma -887	Gamma -618	Gamma -220
PPAR gamma	Control	1	1	1
	TSH (T)	0,18 ± 0,06 <sup>ooo</sup>	0,27 ± 0,02 <sup>ooo</sup>	0,17 ± 0,11 <sup>ooo</sup>
	T + 2-IHDA 10	0,52 ± 0,07 <sup>***</sup>	1,42 ± 0,13 <sup>***</sup>	0,82 ± 0,16 <sup>***</sup>
	T + 2-IHDA 30	2,85 ± 0,21 <sup>***</sup>	1,61 ± 0,11 <sup>***</sup>	2,10 ± 0,15 <sup>***</sup>
	T + siRNA PPARα + 2-IHDA 30	1,61 ± 0,27 <sup>***</sup>	1,45 ± 0,16 <sup>***</sup>	1,65 ± 0,13 <sup>***</sup>
	T + siRNA PPARγ + 2-IHDA 30	0,24 ± 0,04 <sup>aaa</sup>	0,65 ± 0,05 <sup>**aaa</sup>	0,62 ± 0,09 <sup>**aaa</sup>

**Tabla 24:** Análisis por ChIP y qPCR del efecto ejercido por diferentes dosis de 2-IHDA y la acción de los siRNAs específicos para cada subtipo de PPAR sobre la asociación del factor de transcripción PPAR gamma y los sitios identificados dentro de la secuencia contiguo de *Tpo* y *Tg* en células FRTL-5. El nombre de los sitios alude a la ubicación de la secuencia blanco de los PPARs en relación al codón ATG. Los tratamientos se realizaron durante 24h. Cada valor es el resultado de 4-5 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media ± ESM de cada grupo. <sup>ooo</sup>p < 0,001 vs. Control; <sup>\*\*\*</sup>p < 0,001; <sup>\*\*</sup>p < 0,01 y <sup>\*</sup>p < 0,05 vs. TSH; <sup>aaa</sup>p < 0,001 vs. T + 2-IHDA 30.

El gen *Nkx2-1* en su región promotora posee dos posibles sitios de unión para PPAR alfa muy próximos entre si, ubicados a -884 y -840 bp respecto del ATG. Debido a la cercanía entre los sitios y las limitaciones de la técnica utilizada, no se pudo diferenciar la actividad de uno y otro. No obstante, el análisis por ChIP permitió determinar que el 2-IHDA promueve un aumento de la interacción del factor de transcripción PPAR alfa y sus posibles sitios blanco (Tabla 25). La adición del siRNA para el subtipo alfa promueve en contraposición a lo esperado pero al igual que lo observado en *Nis* alfa-605, un aumento de la interacción entre el factor de transcripción y el DNA (Tabla 25).

Factor de transcripción	Tratamiento	Sitios en <i>Nkx2-1</i>
		Alfa -884 & -840
PPAR alfa	Control	1
	TSH (T)	0,20 ± 0,18 <sup>ooo</sup>
	T + 2-IHDA 10	0,44 ± 0,14
	T + 2-IHDA 30	0,89 ± 0,18 ***
	T + siRNA PPARa + 2-IHDA 30	2,57 ± 0,23 *** aaa
	T + siRNA PPARg + 2-IHDA 30	1,29 ± 0,21 ***

**Tabla 25:** Análisis por ChIP y qPCR del efecto ejercido por diferentes dosis de 2-IHDA y la acción de los siRNAs específicos para cada subtipo de PPAR sobre la asociación del factor de transcripción PPAR alfa y el sitio identificado dentro de la secuencia contiguo de *Nkx2-1* en células FRTL-5. El nombre de los sitios alude a la ubicación de la secuencia blanco de los PPARs en relación al codón ATG. Los tratamientos se realizaron durante 24h. Cada valor es el resultado de 4-5 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media ± ESM de cada grupo. <sup>ooo</sup>p< 0,001 vs. Control; \*\*\*p< 0,001; \*\*p< 0,01 y \*p< 0,05 vs. TSH; aaa p<0,001 vs. T + 2-IHDA 30.

El gen *Foxe1* en una extensión de 76 bp posee cuatro sitios de unión para PPAR, dos sitios para el subtipo alfa y dos para el subtipo gamma. Como consecuencia de la cercanía entre ellos solo se pudo determinar la actividad media de los dos sitios para cada subtipo además de poder discriminar entre ellos mismos. El resultado obtenido demostró que el 2-IHDA posee la capacidad de aumentar la interacción entre los PPARs y el DNA. La adición del siRNA para PPARg derivó en la disminución de la actividad del subtipo en cuestión. Por el contrario, la adición del siRNA para PPARa promovió un aumento de la actividad del subtipo alfa (Tabla 26).

Factor de transcripción	Tratamiento	Sitios en <i>Foxe1</i>
		Alfa -1812 & -1794
PPAR alfa	Control	1
	TSH (T)	0,28 ± 0,21 <sup>ooo</sup>
	T + 2-IHDA 10	0,88 ± 0,18 ***
	T + 2-IHDA 30	1,19 ± 0,16 ***
	T + siRNA PPARa + 2-IHDA 30	2,51 ± 0,27 *** aaa
	T + siRNA PPARg + 2-IHDA 30	1,35 ± 0,22 ***
		<b>Gamma - 1795 &amp; -1736</b>
PPAR gamma	Control	1
	TSH (T)	0.51 ± 0,03 <sup>o</sup>
	T + 2-IHDA 10	1,26 ± 0,11 *
	T + 2-IHDA 30	2,52 ± 0,59 ***
	T + siRNA PPARa + 2-IHDA 30	1,79 ± 0,22 **
	T + siRNA PPARg + 2-IHDA 30	0.50 ± 0.08 aaa

**Tabla 26:** Análisis por ChIP y qPCR del efecto ejercido por diferentes dosis de 2-IHDA y la acción de los siRNAs específicos para cada subtipo de PPAR sobre la asociación del factor de transcripción PPAR alfa / gamma en los sitios identificados dentro de la secuencia contiguo de *Foxe1* en células FRTL-5. El nombre de los sitios alude a la ubicación de la secuencia blanco de los PPARs en relación al codón ATG. Los tratamientos se realizaron durante 24h. Cada valor es el resultado de 4-5 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo. <sup>ooo</sup>p< 0,001 vs. Control; <sup>\*\*\*</sup>p< 0,001; <sup>\*\*</sup>p< 0,01 y <sup>\*</sup>p< 0,05 vs. TSH; <sup>aaa</sup>p<0,001 vs. T + 2-IHDA 30.

El análisis realizado *in silico* sobre *Pax8* definió que existe una secuencia dentro del potenciador, más precisamente en el sitio protegido número 5 definido por Nisht et al (2005), donde se encuentran superpuestos los sitios de unión de los dos PPARs en estudio. Los resultados obtenidos demostraron que el sitio posee una alta afinidad por el PPAR gamma. Por el contrario, no se detectaron diferencias para el PPAR alfa en las condiciones ensayadas (resultados no mostrados). La adición del siRNA en contra del PPARg disminuyó de manera significativa la actividad promovida por el iodolípido (Tabla 27).

Factor de transcripción	Tratamiento	Sitio en <i>Pax8</i>
		-84,4 Kb
PPAR gamma	Control	1
	TSH (T)	0,01 $\pm$ 0,05 <sup>ooo</sup>
	T + 2-IHDA 10	0,26 $\pm$ 0,09 <sup>*</sup>
	T + 2-IHDA 30	2,20 $\pm$ 0,42 <sup>***</sup>
	T + siRNA PPARa + 2-IHDA 30	1,47 $\pm$ 0,14 <sup>***</sup>
	T + siRNA PPARg + 2-IHDA 30	0,61 $\pm$ 0,26 <sup>** aaa</sup>

**Tabla 27:** Análisis por ChIP y qPCR del efecto ejercido por diferentes dosis de 2- y la acción de los siRNAs específicos para cada subtipo de PPAR sobre la asociación del factor de transcripción PPAR gamma y el sitio identificado dentro de la secuencia contiguo de *Pax8* en células FRTL-5. El nombre de los sitios alude a la ubicación de la secuencia blanco de los PPARs en relación al codón ATG. Los tratamientos se realizaron durante 24h. Cada valor es el resultado de 4-5 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo. <sup>ooo</sup>p< 0,001 vs. Control; <sup>\*\*\*</sup>p< 0,001; <sup>\*\*</sup>p< 0,01 y <sup>\*</sup>p< 0,05 vs. TSH; <sup>aaa</sup>p<0,001 vs. T + 2-IHDA 30.

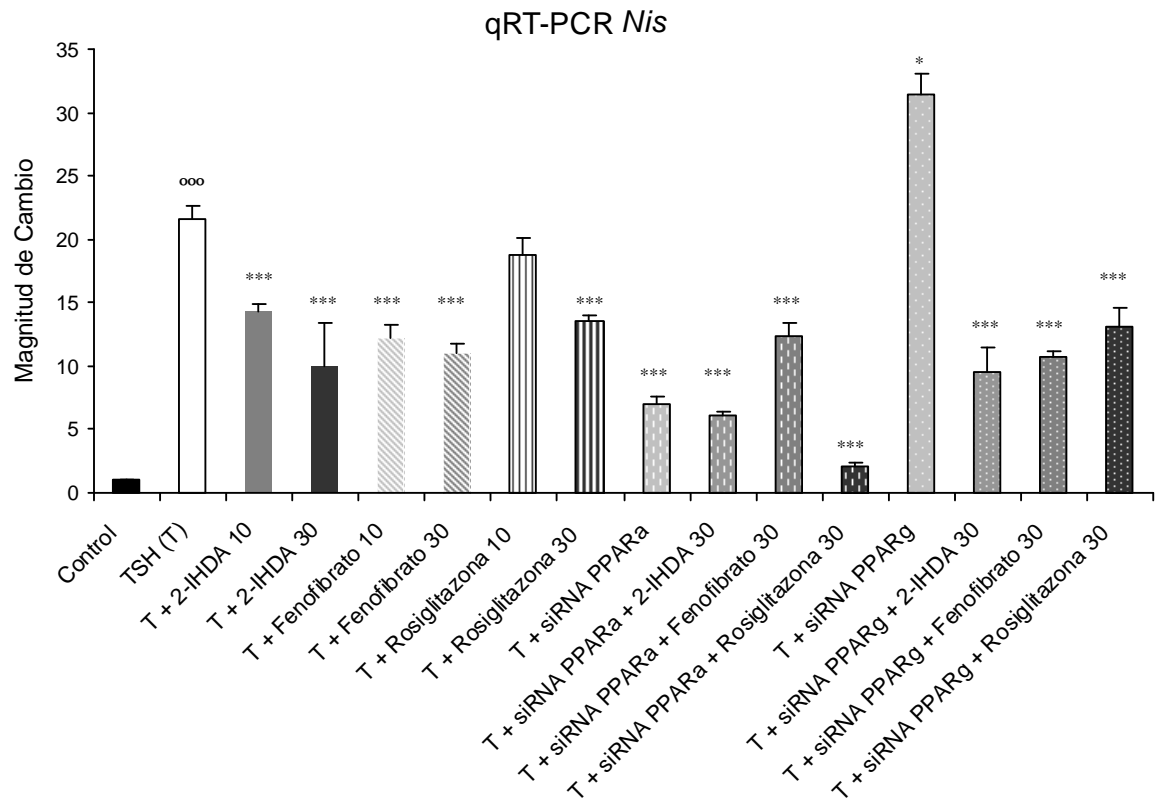
### 3) Estudio de la modulación del RNAm por activación e inhibición de los PPARs

Los datos obtenidos han demostrado que el 2-IHDA posee la capacidad de activar dos subtipos de PPARs, el alfa y el gamma. Además hemos identificado que estos factores de transcripción poseen sitios de unión al DNA en genes como *Nis*, *Tpo*, *Tg*, *Pax8*, *Nkx2-1* y *Foxe1*. Por lo tanto como paso siguiente se procedió a determinar si estos cambios relativos en la modulación de la activación de los PPARs poseen efecto sobre el RNAm de los genes mencionados y de los mismos PPAR alfa y PPAR gamma. Para ello se realizó la cuantificación mediante qRT-PCR utilizando además del 2-IHDA, agonistas para los dos subtipos y siRNAs para su parcial silenciamiento.

Los resultados obtenidos para *Nis* y *Tpo*, demuestran que los agonistas mimetizan los efectos del 2-IHDA, salvo rosiglitazona maleato sobre *Tpo*. El fenofibrato posee una mayor capacidad de modulación negativa al compararlo con rosiglitazona maleato (Tabla 28 y Figuras 26 y 27).

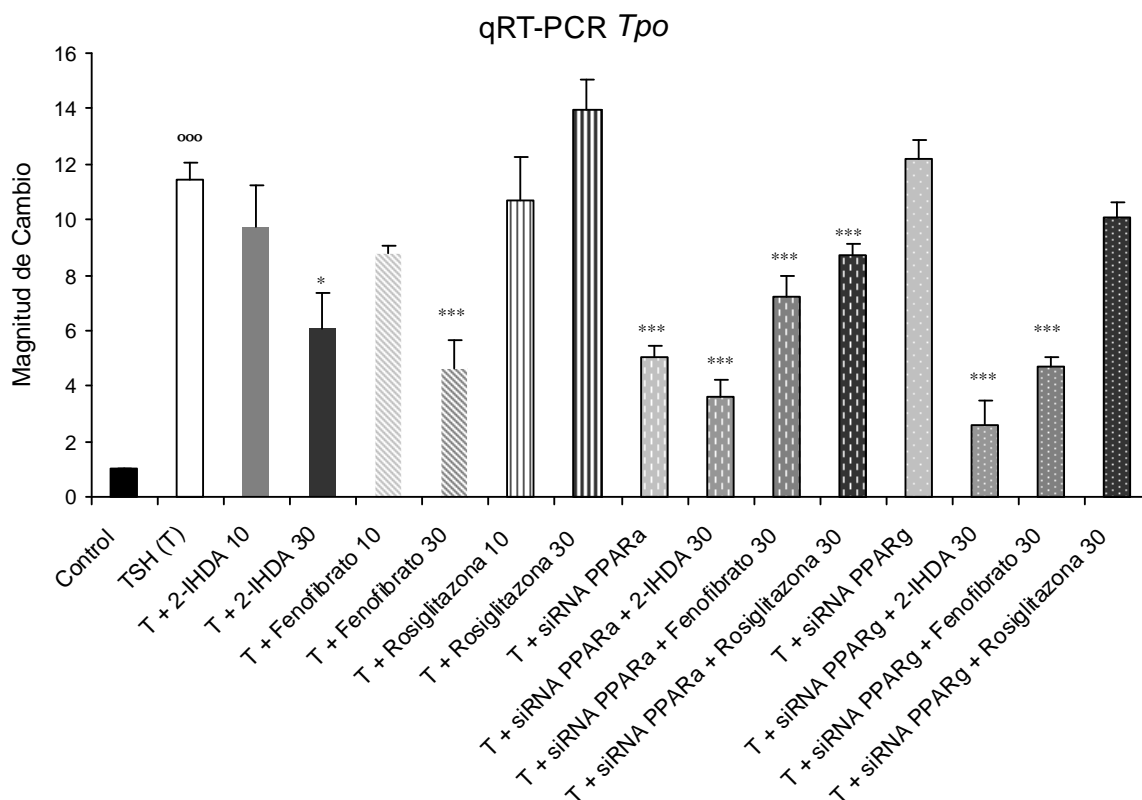
Cuando se silenciaron los genes de manera parcial, el siRNA PPAR $\alpha$  promovió una disminución de los niveles de RNAm de *Nis* y *Tpo*. El siRNA para PPAR $\gamma$  por el contrario demostró un aumento significativo de *Nis* pero no de *Tpo* respecto de TSH.

Por otro lado, la adición de siRNA para PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  no inhibió el efecto del iodolípido sobre estos genes.



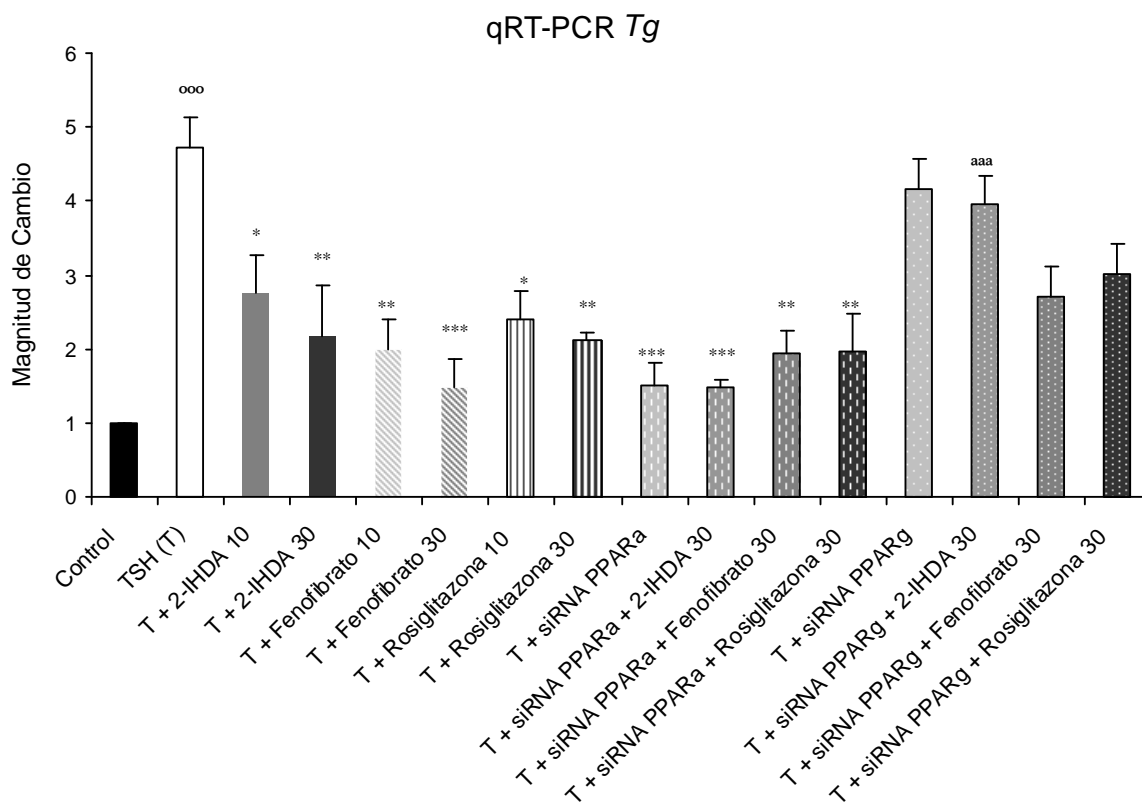
**Figura 26:** Cuantificación por PCR en tiempo real del efecto ejercido por diferentes concentraciones de 2-IHDA, por el agonista de PPAR alfa (fenofibrato), por el agonista de PPAR gamma (rosiglitazona maleato) y siRNAs PPARs específicos sobre la modulación del RNAm de *Nis* en células FRTL-5. Los tratamientos fueron aplicados durante 24 h. Cada valor es el resultado de 4-5 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo. <sup>ooo</sup>p < 0,001 vs. Control; <sup>\*\*\*</sup>p < 0,001; <sup>\*\*</sup>p < 0,01 y <sup>\*</sup>p < 0,05 vs. TSH; <sup>aaa</sup>p < 0,001 vs. T + 2-IHDA 30.





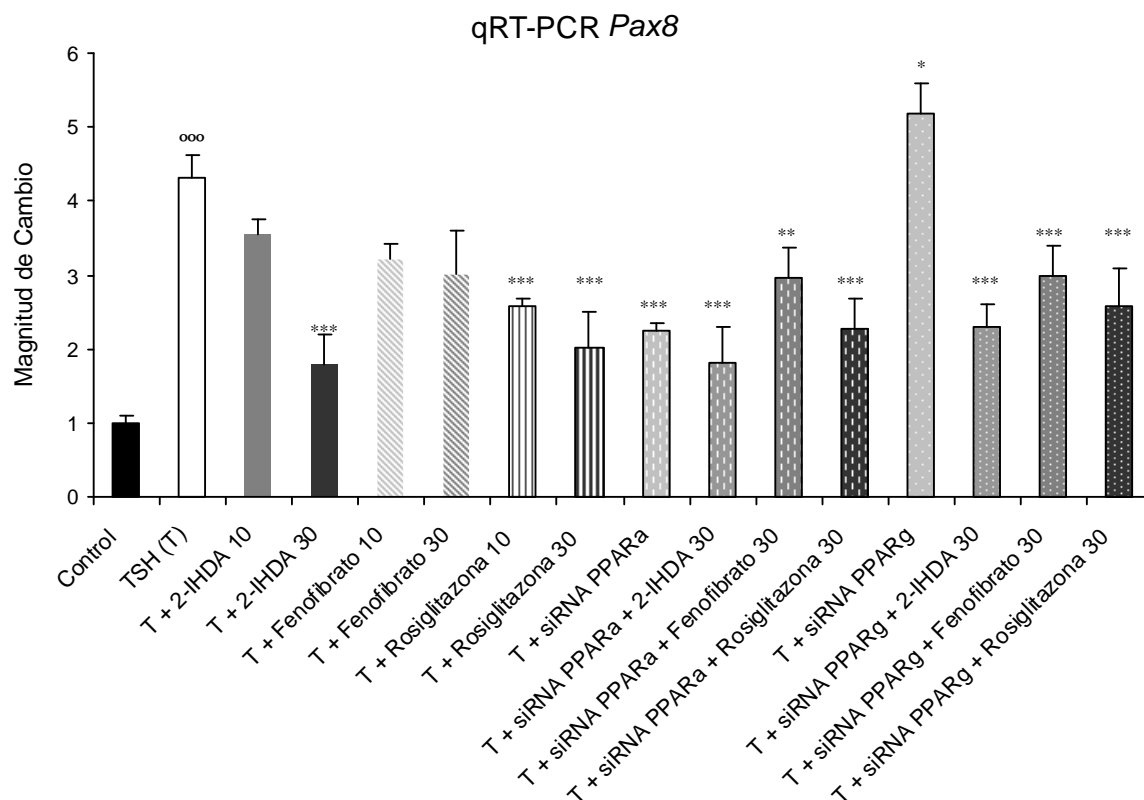
**Figura 27:** Cuantificación por PCR en tiempo real del efecto ejercido por diferentes concentraciones de 2-IHDA, por el agonista de PPAR alfa (fenofibrato), por el agonista de PPAR gamma (rosiglitazona maleato) y siRNAs PPARs específicos sobre la modulación del RNAm de *Tpo* en células FRTL-5. Los tratamientos fueron aplicados durante 24 h. Cada valor es el resultado de 4-5 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo. <sup>000</sup>p < 0,001 vs. Control; <sup>\*\*\*</sup>p < 0,001; <sup>\*\*</sup>p < 0,01 y <sup>\*</sup>p < 0,05 vs. TSH; <sup>aaa</sup>p < 0,001 vs. T + 2-IHDA 30.

Con respecto a *Tg*, la aplicación de los agonistas de los PPARs modularon de manera negativa y significativa los niveles de RNAm mimetizando los efectos ocasionados por el 2-IHDA. El silenciamiento del PPARα, al igual que en *Nis* y *Tpo*, impulsó una disminución de los niveles de *Tg* respecto de TSH, no así con el silenciamiento del PPARγ. En lo que respecta a la acción del 2-IHDA no se observó diferencia entre siRNA PPARα + 2-IHDA vs. 2-IHDA. La aplicación del tratamiento siRNA PPARγ inhibió la acción del iodolípido (Figura 28).



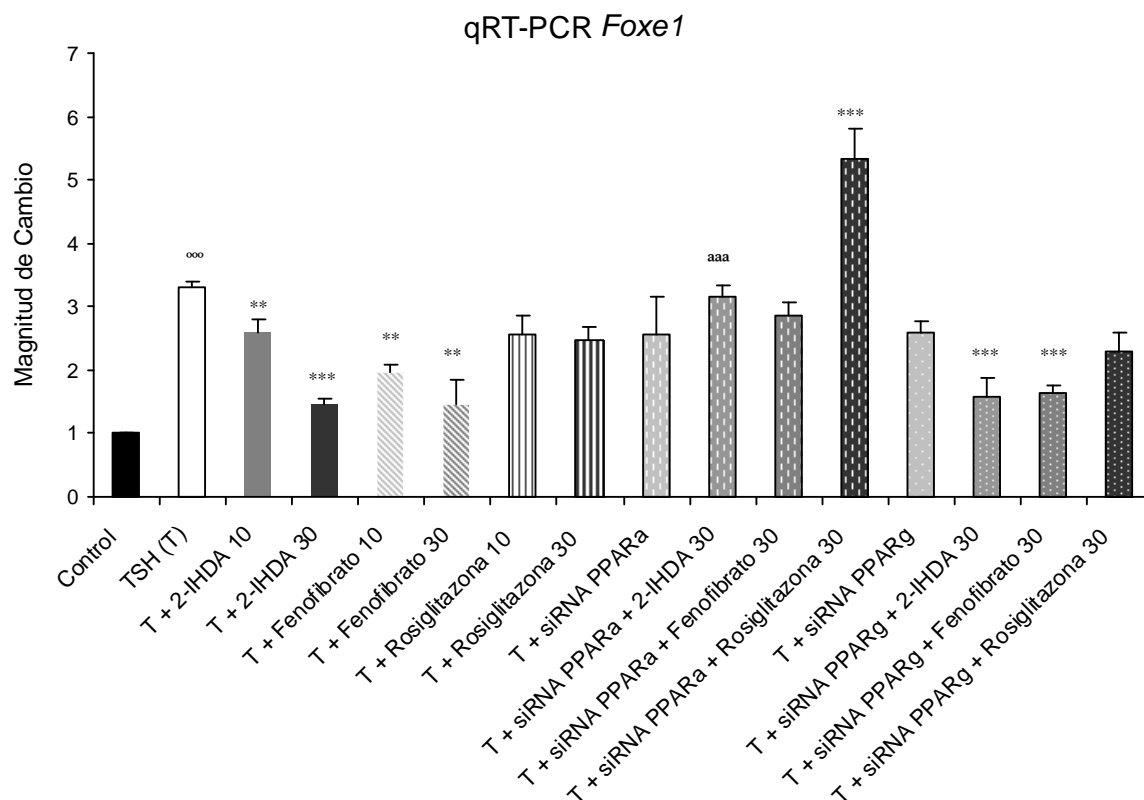
**Figura 28:** Cuantificación por PCR en tiempo real del efecto ejercido por diferentes concentraciones de 2-IHDA, por el agonista de PPAR alfa (fenofibrato), por el agonista de PPAR gamma (rosiglitazona maleato) y siRNAs PPARs específicos sobre la modulación del RNAm de *Tg* en células FRTL-5. Los tratamientos fueron aplicados durante 24 h. Cada valor es el resultado de 4-5 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo. <sup>ooo</sup>p < 0,001 vs. Control; <sup>\*\*\*</sup>p < 0,001; <sup>\*\*</sup>p < 0,01 y <sup>\*</sup>p < 0,05 vs. TSH; <sup>aaa</sup>p < 0,001 vs. T + 2-IHDA 30.

*Pax8* se vió modulado en forma negativa por el compuesto halogenado y por el agonista Rosiglitazona maleato. El efecto ocasionado por el 2-IHDA no pudo ser revertido mediante el silenciamiento de los PPARs. El RNA de interferencia para el subtipo alfa reguló de manera negativa los niveles de RNAm; en contraposición el silenciamiento del PPARγ impulsó un aumento (Figura 29).



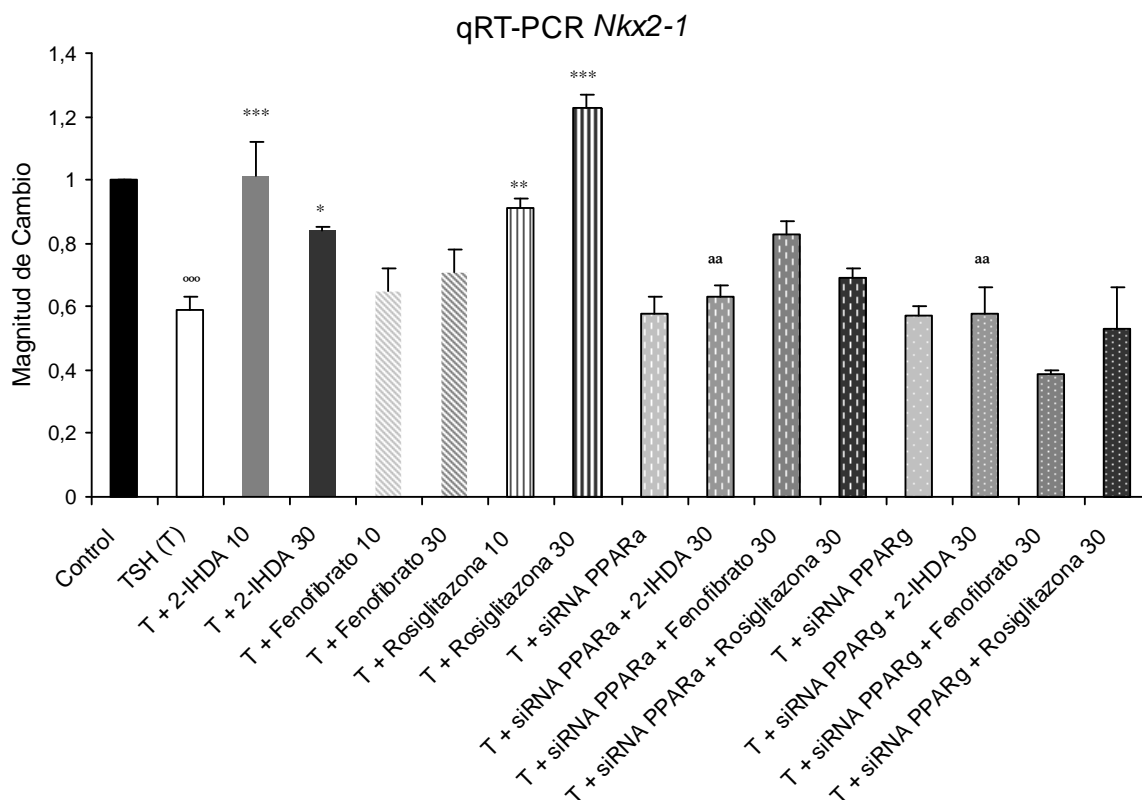
**Figura 29:** Cuantificación por PCR en tiempo real del efecto ejercido por diferentes concentraciones de 2-IHDA, agonista de PPAR alfa (fenofibrato), agonista de PPAR gamma (rosiglitazona maleato) y siRNAs PPARs específicos sobre la modulación del RNAm de *Pax8* en células FRTL-5. Los tratamientos fueron aplicados durante 24 h. Cada valor es el resultado de 4-5 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo. <sup>ooo</sup>p < 0,001 vs. Control; <sup>\*\*\*</sup>p < 0,001; <sup>\*\*</sup>p < 0,01 y <sup>\*</sup>p < 0,05 vs. TSH; <sup>aaa</sup>p < 0,001 vs. T + 2-IHDA 30.

*Foxe1* es graduado de manera negativa por el 2-IHDA y solo es mimetizado por el agonista del PPAR alfa. El silenciamiento de los dos subtipos no altera los niveles de RNAm y el efecto del iodolípido es revertido solo por el silenciamiento de PPAR alfa. Es destacable el dato obtenido en el cual ante la adición de siRNA PPARα + Rosiglitazona maleato se observa un aumento pronunciado y significativo de los niveles de *Foxe1* (Figura 30).



**Figura 30:** Cuantificación por PCR en tiempo real del efecto ejercido por diferentes concentraciones de 2-IHDA, agonista de PPAR alfa (fenofibrato), agonista de PPAR gamma (rosiglitazona maleato) y siRNAs PPARs específicos sobre la modulación del RNAm de *Foxe1* en células FRTL-5. Los tratamientos fueron aplicados durante 24 h. Cada valor es el resultado de 4-5 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo. <sup>000</sup>p < 0,001 vs. Control; <sup>\*\*\*</sup>p < 0,001; <sup>\*\*</sup>p < 0,01 y <sup>\*</sup>p < 0,05 vs. TSH; <sup>aaa</sup>p < 0,001 vs. T + 2-IHDA 30.

*Nkx2-1* es modulado de manera positiva por el 2-IHDA y por el agonista de PPAR gamma. La aplicación de los siRNA no posee efecto sobre los niveles de RNAm y ambos promueven la inhibición del efecto del iodolípido (Figura 31).



**Figura 31:** Cuantificación por PCR en tiempo real del efecto ejercido por diferentes concentraciones de 2-IHDA, agonista de PPAR alfa (fenofibrato), agonista de PPAR gamma (rosiglitazona maleato) y siRNAs PPARs específicos sobre la modulación del RNAm de *Nkx2-1* en células FRTL-5. Los tratamientos fueron aplicados durante 24 h. Cada valor es el resultado de 4-5 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo. <sup>000</sup>p < 0,001 vs. Control; \*\*\*p < 0,001; \*\*p < 0,01 y \*p < 0,05 vs. TSH; <sup>aaa</sup>p < 0,001 vs. T + 2-IHDA 30.

Con el objetivo de ahondar en la comprensión de la relación entre la activación de los PPARs y la modulación de los genes tiroideos de interés, es que se procedió a determinar la expresión de los niveles de RNAm de *Ppara* y *Pparg*. También se estudió el nivel de modulación que ejerció la adición de los siRNAs sobre cada subtipo específico y la relación entre los mismos.

Los resultados obtenidos determinaron que sorpresivamente mientras la TSH estimula su expresión, el 2-IHDA posee efectos inhibitorios sobre el *Ppara* alfa al igual

que sobre el PPAR $\gamma$ . Se observó que el agonista de PPAR $\alpha$  moduló negativamente ambas isoformas; por el contrario el otro agonista no tuvo efecto alguno (Tabla 29 y Figura 32). El silenciamiento de los PPARs fue de aproximadamente un 53% para ambas isoformas con sus respectivos siRNAs. La adición del siRNA para PPAR $\alpha$  no impide la respuesta inhibitoria de Fenofibrato como era de esperar. Sorpresivamente la adición del siRNA para PPAR $\gamma$  + Rosiglitazona maleato 30 inhiben los niveles del RNA de PPAR $\alpha$ .

En cuanto a los efectos de los siRNAs sobre la acción del 2-IHDA, el único efecto no esperable fué que la adición del siRNA para PPAR $\gamma$  + 2-IHDA 30 revirtió el efecto inhibitorio de ambos por sí solos (Fig 33).

Tratamiento	Gen		
	<i>Nis</i>	<i>Tpo</i>	<i>Tg</i>
Control	1	1	1
TSH (T)	21,56 $\pm$ 1,1 <sup>000</sup>	11,46 $\pm$ 0,6 <sup>000</sup>	4,73 $\pm$ 0,4 <sup>000</sup>
T + Fenofibrato 10	12,21 $\pm$ 1,1 <sup>***</sup>	8,75 $\pm$ 0,3	2,00 $\pm$ 0,4 <sup>**</sup>
T + Fenofibrato 30	10,96 $\pm$ 0,8 <sup>***</sup>	4,64 $\pm$ 1,0 <sup>***</sup>	1,47 $\pm$ 0,4 <sup>***</sup>
T + Rosiglitazona 10	18,77 $\pm$ 1,3	10,66 $\pm$ 1,6	2,39 $\pm$ 0,4 <sup>*</sup>
T + Rosiglitazona 30	13,58 $\pm$ 0,4 <sup>***</sup>	13,96 $\pm$ 1,1	2,11 $\pm$ 0,1 <sup>**</sup>
T + siRNA alfa	7,04 $\pm$ 0,6 <sup>***</sup>	5,05 $\pm$ 0,4 <sup>***</sup>	1,51 $\pm$ 0,3 <sup>***</sup>
T + siRNA alfa + Fenofibrato 30	12,35 $\pm$ 1,0 <sup>***</sup>	7,19 $\pm$ 0,8 <sup>**</sup>	1,95 $\pm$ 0,3 <sup>**</sup>
T + siRNA alfa + Rosiglitazona 30	2,02 $\pm$ 0,4 <sup>***</sup>	8,74 $\pm$ 0,4	1,97 $\pm$ 0,5 <sup>**</sup>
T + siRNA gamma	31,49 $\pm$ 1,5 <sup>***</sup>	12,17 $\pm$ 0,7	4,16 $\pm$ 0,4
T + siRNA gamma + Fenofibrato 30	10,70 $\pm$ 0,4 <sup>***</sup>	4,73 $\pm$ 0,3 <sup>***</sup>	2,71 $\pm$ 0,4
T + siRNA gamma + Rosiglitazona 30	18,17 $\pm$ 1,5	10,10 $\pm$ 0,5	3,01 $\pm$ 0,4
Control	1	1	1
TSH (T)	21,56 $\pm$ 1,1 <sup>000</sup>	11,46 $\pm$ 0,6 <sup>000</sup>	4,73 $\pm$ 0,4 <sup>000</sup>
T + siRNA alfa	7,04 $\pm$ 0,6 <sup>***</sup>	5,05 $\pm$ 0,4 <sup>***</sup>	1,51 $\pm$ 0,3 <sup>***</sup>
T + siRNA gamma	31,49 $\pm$ 1,5 <sup>***</sup>	12,17 $\pm$ 0,7	4,16 $\pm$ 0,4
T + 2-IHDA 10	14,27 $\pm$ 0,6 <sup>***</sup>	9,73 $\pm$ 1,5 <sup>*</sup>	2,77 $\pm$ 0,5 <sup>*</sup>
T + 2-IHDA 30	10,05 $\pm$ 3,3 <sup>***</sup>	6,03 $\pm$ 1,3 <sup>***</sup>	2,17 $\pm$ 0,7 <sup>**</sup>
T + siRNA alfa + 2-IHDA 30	6,08 $\pm$ 0,3 <sup>***</sup>	3,61 $\pm$ 3,6 <sup>***</sup>	1,48 $\pm$ 0,1 <sup>***</sup>
T + siRNA gamma + 2-IHDA 30	9,51 $\pm$ 1,9 <sup>***</sup>	2,58 $\pm$ 0,9 <sup>***</sup>	3,95 $\pm$ 0,4 <sup>aaa</sup>

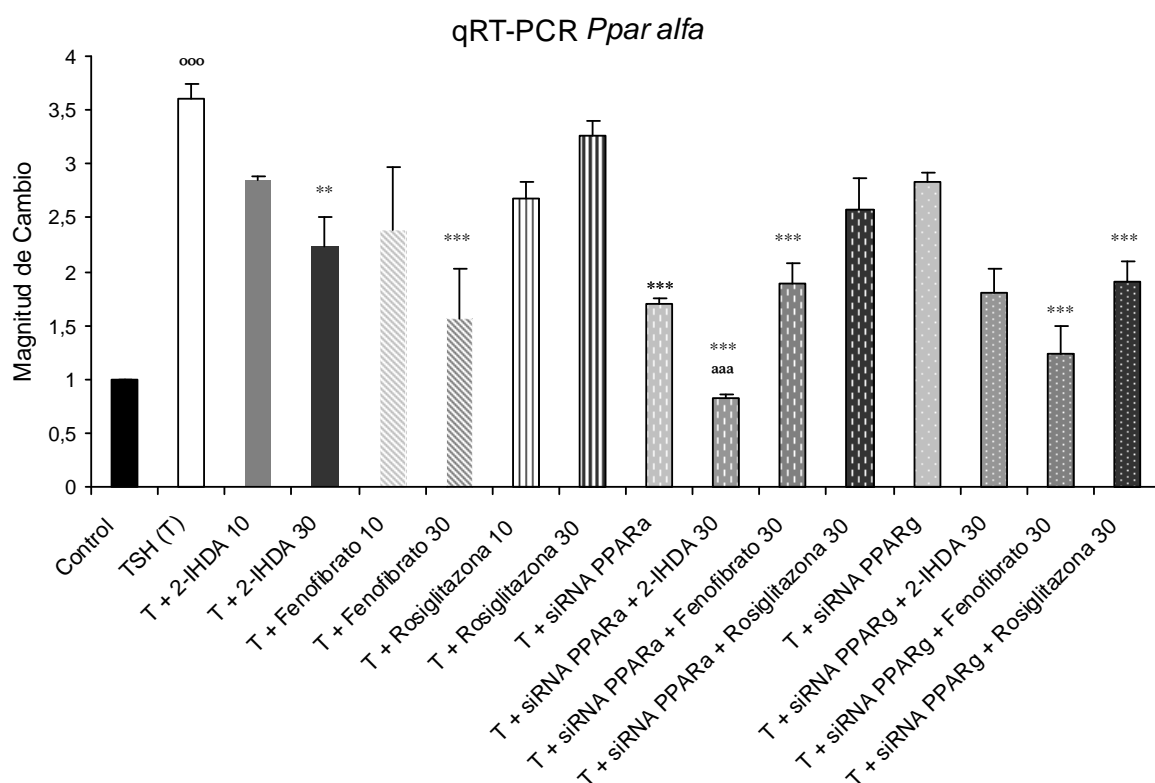
Tratamiento	Gen		
	<i>Pax8</i>	<i>Foxe1</i>	<i>Nkx2-1</i>
Control	1	1	1
TSH (T)	4,31 ± 0,1 <sup>000</sup>	3,30 ± 0,1 <sup>000</sup>	0,59 ± 0,04 <sup>000</sup>
T + Fenofibrato 10	3,21 ± 0,4	1,98 ± 0,1 <sup>**</sup>	0,65 ± 0,07
T + Fenofibrato 30	3,01 ± 0,2	1,45 ± 0,4 <sup>**</sup>	0,71 ± 0,07
T + Rosiglitazona 10	2,59 ± 0,6 <sup>***</sup>	2,55 ± 0,3	0,91 ± 0,03 <sup>**</sup>
T + Rosiglitazona 30	2,01 ± 0,1 <sup>***</sup>	2,48 ± 0,2	1,23 ± 0,04 <sup>***</sup>
T + siRNA alfa	2,24 ± 0,5 <sup>***</sup>	2,55 ± 0,6	0,58 ± 0,05
T + siRNA alfa + Fenofibrato 30	2,96 ± 0,4 <sup>**</sup>	2,87 ± 0,2	0,83 ± 0,04
T + siRNA alfa + Rosiglitazona 30	2,28 ± 0,4 <sup>***</sup>	5,32 ± 0,5 <sup>***</sup>	0,69 ± 0,03
T + siRNA gamma	5,18 ± 0,4	2,58 ± 0,2	0,57 ± 0,03
T + siRNA gamma + Fenofibrato 30	3,00 ± 0,4 <sup>**</sup>	1,65 ± 0,1 <sup>***</sup>	0,39 ± 0,01
T + siRNA gamma + Rosiglitazona 30	2,58 ± 0,5 <sup>***</sup>	2,29 ± 0,3	0,53 ± 0,13
Control	1	1	1
TSH (T)	4,31 ± 0,1 <sup>000</sup>	3,30 ± 0,1 <sup>000</sup>	0,59 ± 0,04 <sup>000</sup>
T + siRNA alfa	2,24 ± 0,5 <sup>***</sup>	2,55 ± 0,6	0,58 ± 0,05
T + siRNA gamma	5,18 ± 0,4 <sup>*</sup>	2,58 ± 0,2	0,57 ± 0,03
T + 2-IHDA 10	3,56 ± 0,3	2,06 ± 0,2 <sup>**</sup>	1,01 ± 0,11 <sup>***</sup>
T + 2-IHDA 30	1,80 ± 0,2 <sup>***</sup>	1,46 ± 0,1 <sup>***</sup>	0,84 ± 0,01 <sup>**</sup>
T + siRNA alfa + 2-IHDA 30	1,81 ± 0,1 <sup>***</sup>	3,15 ± 0,2 <sup>aaa</sup>	0,63 ± 0,04 <sup>aa</sup>
T + siRNA gamma + 2-IHDA 30	2,30 ± 0,3 <sup>***</sup>	1,59 ± 0,3 <sup>***</sup>	0,58 ± 0,08 <sup>aa</sup>

**Tabla 28:** Cuantificación por PCR en tiempo real del efecto ejercido por diferentes concentraciones de 2-IHDA, fenofibrato, rosiglitazona maleato y siRNAs PPARs específicos sobre la modulación de los niveles de RNAm de genes tiroideos en células FRTL-5. Los tratamientos fueron aplicados durante 24 h. Cada valor es el resultado de 4-5 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media ± ESM de cada grupo. <sup>000</sup>p< 0,001 vs. Control; <sup>\*\*\*</sup>p< 0,001; <sup>\*\*</sup>p< 0,01 y <sup>\*</sup>p< 0,05 vs. TSH; <sup>aa</sup>p< 0,01; <sup>aaa</sup>p<0,001 vs. T + 2-IHDA 30.

Tratamiento	GEN	
	<i>Ppar alfa</i>	<i>Ppar gamma</i>
Control	1	1
TSH (T)	3,6 ± 0,15 <sup>000</sup>	2,49 ± 0,13 <sup>000</sup>
T + Fenofibrato 10	2,39 ± 0,58	1,49 ± 0,16 <sup>***</sup>
T + Fenofibrato 30	1,57 ± 0,46 <sup>***</sup>	1,05 ± 0,17 <sup>***</sup>
T + Rosiglitazona 10	2,67 ± 0,16	2,13 ± 0,15
T + Rosiglitazona 30	3,27 ± 0,13	2,17 ± 0,25
T + siRNA alfa	1,7 ± 0,05 <sup>***</sup>	2,11 ± 0,13
T + siRNA alfa + Fenofibrato 30	1,89 ± 0,18 <sup>***</sup>	1,64 ± 0,16 <sup>**</sup>
T + siRNA alfa + Rosiglitazona 30	2,57 ± 0,29	2,05 ± 0,17
T + siRNA gamma	2,83 ± 0,08	1,18 ± 0,08 <sup>***</sup>
T + siRNA gamma + Fenofibrato 30	1,23 ± 0,27 <sup>***</sup>	1,33 ± 0,18 <sup>***</sup>
T + siRNA gamma + Rosiglitazona 30	1,91 ± 0,18 <sup>***</sup>	1,56 ± 0,04 <sup>***</sup>
Control	1	1
TSH (T)	3,6 ± 0,15 <sup>000</sup>	2,49 ± 0,13 <sup>000</sup>
T + 2-IHDA 10	2,85 ± 0,04	1,45 ± 0,13 <sup>***</sup>
T + 2-IHDA 30	2,23 ± 0,27 <sup>**</sup>	1,31 ± 0,24 <sup>***</sup>
T + siRNA alfa	1,7 ± 0,05 <sup>***</sup>	2,11 ± 0,13
T + siRNA gamma	2,83 ± 0,08	1,18 ± 0,08 <sup>***</sup>

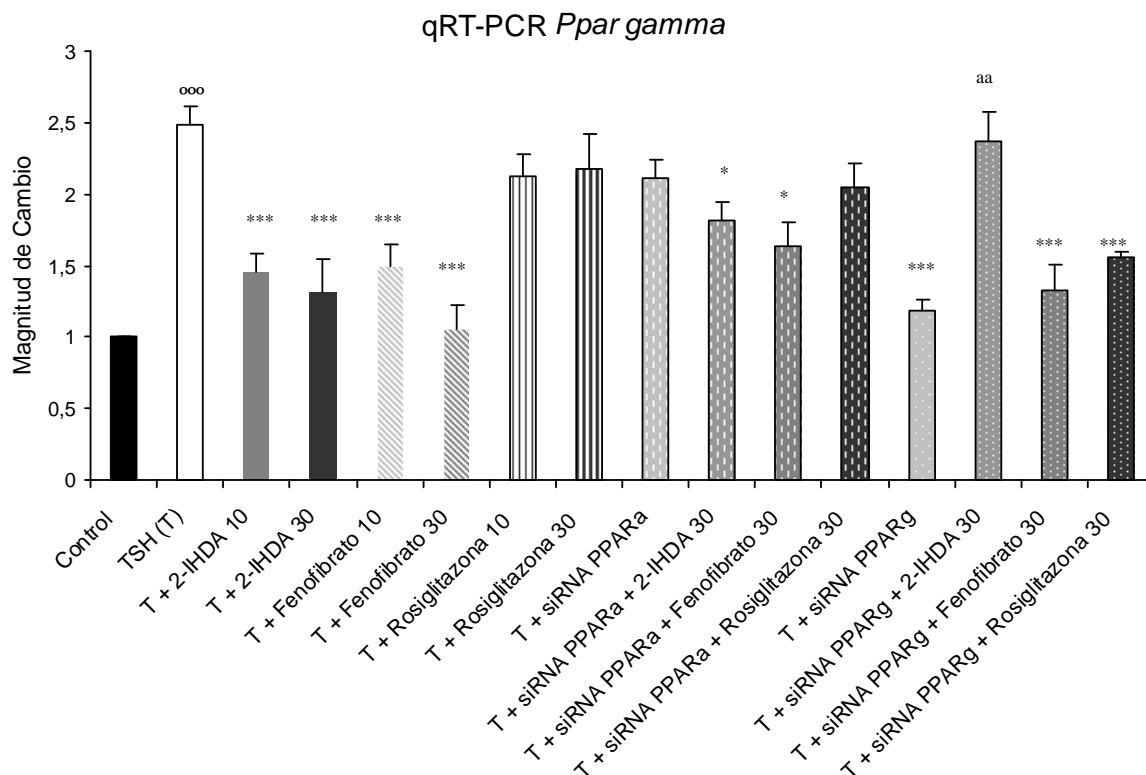
T + siRNA alfa + 2-IHDA 30	0,82 ± 0,04 ***	1,81 ± 0,13 *
T + siRNA gamma + 2-IHDA 30	1,8 ± 0,22 ***	2,37 ± 0,20 <sup>aaa</sup>

**Tabla 29:** Cuantificación por PCR en tiempo real del efecto ejercido por diferentes concentraciones de 2-IHDA, agonista de PPAR alfa (fenofibrato), agonista de PPAR gamma (rosiglitazona maleato) y siRNAs PPARs específicos sobre la modulación de los niveles de RNAm de *Ppar alfa* y *Ppar gamma* en células FRTL-5. Los tratamientos fueron aplicados durante 24 h. Cada valor es el resultado de 4-5 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media ± ESM de cada grupo. <sup>ooo</sup>p< 0,001 vs. Control; \*\*\*p< 0,001; \*\*p< 0,01 y \*p< 0,05 vs. TSH; <sup>aaa</sup>p<0,001 vs. T + siRNA gamma y vs. T+ 2-IHDA.



**Figura 32:** Cuantificación por PCR en tiempo real del efecto ejercido por diferentes concentraciones de 2-IHDA, agonista de PPAR alfa (fenofibrato), agonista de PPAR gamma (rosiglitazona maleato) y siRNAs PPARs específicos sobre la modulación de los niveles de RNAm de *Ppar alfa* en células FRTL-5. Los tratamientos fueron aplicados durante 24 h. Cada valor es el resultado de 4-5 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media ± ESM de cada grupo. <sup>ooo</sup>p< 0,001 vs. Control; \*\*\*p< 0,001; \*\*p< 0,01 y \*p< 0,05 vs. TSH; <sup>aaa</sup>p<0,001 vs. T + 2-IHDA 30.





**Figura 33:** Cuantificación por PCR en tiempo real del efecto ejercido por diferentes concentraciones de 2-IHDA, agonista de PPAR alfa (fenofibrato), agonista de PPAR gamma (rosiglitazona maleato) y siRNAs PPARs específicos sobre la modulación de los niveles de RNAm de *Ppar gamma* en células FRTL-5. Los tratamientos fueron aplicados durante 24 h. Cada valor es el resultado de 4-5 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo. <sup>000</sup>p < 0,001 vs. Control; \*\*\*p < 0,001; \*\*p < 0,01 y \*p < 0,05 vs. TSH; <sup>aa</sup>p < 0,001 vs. T + 2-IHDA 30.

#### 4) Estudio de la captación de <sup>125</sup>I por activación e inhibición de los PPARs

A fin de establecer si los cambios observados en los niveles de RNAm por el efecto del 2-IHDA y su posible mediación a través de los factores nucleares PPAR alfa y PPAR gamma, tienen efecto a nivel fisiológico en la célula, se procedió a realizar estudios de captación de <sup>125</sup>I. Los datos obtenidos se correlacionan con los niveles de RNAm determinados anteriormente, donde se demuestra que el 2-IHDA

junto a los agonistas de los PPARs promueven una disminución en la captación del yodo. En igual sentido la adición de los siRNAs específicos para cada subtipo no impiden que el iodolípido ejerza su efecto de inhibición, pero sí se observa una recuperación parcial en la capacidad de captar el halógeno. Al igual que lo observado por qRT-PCR donde el silenciamiento parcial del PPAR $\gamma$  promueve un aumento significativo de los niveles de RNAm de *Nis*, aquí se observó un aumento significativo en la captación de  $^{125}\text{I}$  (Tabla 30).

Tratamiento	$^{125}\text{I}$ c.p.m./ $\mu\text{g}$ proteína
Control	3,18
TSH (T)	18,22 $\pm$ 0,36 <sup>000</sup>
T + 2-IHDA 10	10,62 $\pm$ 0,23 ***
T + 2-IHDA 30	4,89 $\pm$ 0,13 ***
T + Fenofibrato 10	10,46 $\pm$ 0,25 ***
T + Fenofibrato 30	6,20 $\pm$ 0,26 ***
T + Rosiglitazona 10	15,93 $\pm$ 0,41
T + Rosiglitazona 30	8,20 $\pm$ 0,31 ***
T + siRNA alfa	13,61 $\pm$ 0,51 ***
T + siRNA alfa + 2-IHDA 30	10,84 $\pm$ 0,19 *** aa
T + siRNA gamma	22,04 $\pm$ 0,48
T + siRNA gamma + 2-IHDA 30	10,52 $\pm$ 0,24 *** aa

**Tabla 30:** Efecto del 2-IHDA, agonistas de los PPARs y siRNAs sobre la captación de  $^{125}\text{I}$  en células FRTL-5 a las 24 h de tratamiento. Los resultados fueron normalizados mediante cuantificación proteica por el método de *Lowry*. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM de cada grupo. <sup>0</sup>p < 0,001 vs. Control; \*\*p < 0,01; \*p < 0,05 vs. TSH; aa p < 0,01 vs. T + 2-IHDA 30.

### E) Estudio de la regulación epigenética de los genes tiroideos a través del estudio de la acetilación de Histona H3 por Chip- PCR en tiempo real

Ante los resultados expuestos donde se observa que el 2-IHDA posee la capacidad de modular tanto de manera positiva como negativa la expresión de genes tiroideos y la firme correlación que existe entre los parámetros fisiológicos de

la célula tiroidea y la actividad de los factores de transcripción se trató de determinar si el KI o el iodolípido ejercen una regulación epigenética. Con el fin de determinar una modulación en la condensación de la cromatina se analizó mediante ChIP la acetilación de histonas H3 asociadas a las regiones promotoras de *Nis*, *Tpo* y *Tg*. En todos los casos se observó que la TSH induce la acetilación de dicha proteína. En igual sentido pero opuesto a lo esperado la aplicación del 2-IHDA promueve un aumento significativo en la detección de la proteína acetilada. Por otra parte el KI solo posee efectos significativos sobre la región promotora de *Tg* en sentido opuesto al iodolípido (Tabla 31).

tratamiento	Región promotora		
	<i>Nis</i>	<i>Tpo</i>	<i>Tg</i>
Control	1	1	1
TSH (T)	11,65 ± 1,03 <sup>000</sup>	10,67 ± 2,08 <sup>00</sup>	7,13 ± 0,75 <sup>00</sup>
T + 2-IHDA 10	28,01 ± 4,05 *	15,14 ± 0,48	4,89 ± 1,44
T + 2-IHDA 30	60,72 ± 7,38 ***	33,04 ± 1,69 ***	83,58 ± 8,27 ***
T + KI 10	16,58 ± 8,30	6,57 ± 1,43	1,56 ± 0,81 *
T + KI 30	21,40 ± 7,60	14,65 ± 1,00	1,43 ± 0,83 *

**Tabla 31:** Análisis por ChIP y qPCR del efecto ejercido por diferentes dosis de 2- IHDA y KI sobre la acetilación de histona H3 y su asociación al DNA en la región promotora proximal de *Nis*, *Tpo* y *Tg* en células FRTL-5. Los tratamientos se realizaron durante 24h. Cada valor es el resultado de 4-5 ensayos experimentales independientes y por cuadruplicado. Los resultados son expresados como la media ± ESM de cada grupo. <sup>000</sup>p< 0,001 vs. Control; \*\*\*p< 0,001; \*\*p< 0,01 y \*p< 0,05 vs. TSH.

## **Discusión**

La ingesta de yoduro en la dieta alimenticia es de real importancia debido a que es utilizado por la tiroides para sintetizar hormonas tiroideas ( $T_3$  y  $T_4$  principalmente), además de regular la función y proliferación de la tiroides. Desempeña un papel central en el efecto “Wolff-Chaikoff” y modula parámetros como síntesis de proteínas totales, síntesis y proteólisis de Tg, síntesis de Tpo y Nis, captación de glucosa, amino ácidos, yoduro y uridina, flujo sanguíneo a través de la glándula tiroides, secreción de HT, generación de  $H_2O_2$  y crecimiento glandular (Juvenal et al., 2011).

La mayoría de los efectos inhibitorios del yoduro son abolidos por las tionamidas las cuales actúan como un agente bloqueante de la organificación del yodo. Por lo tanto fue postulada la intermediación de un compuesto orgánico yodado en su mecanismo de acción (Van Sande et al., 1975). A pesar de que la naturaleza de este compuesto aun no ha sido identificada, se propusieron a los iodolípidos como posibles mediadores. Pereira et al (1990) aislaron e identificaron al 2-iodohexadecanal (2-IHDA) como el lípido de mayor síntesis en cortes de tiroides de caballo; luego estos resultados fueron confirmados en perro y rata (Panneels et al., 1996; Pereira et al., 1990). Se ha postulado que la biosíntesis de este iodolípido podría tener lugar a partir de la adición de yoduro al grupo vinil éter de los plasmalógenos presentes en la membrana baso lateral.

Se ha postulado al 2-IHDA como el mediador del efecto Wolff-Chaikoff (Panneels et al., 1994a). Además se observó una inhibición de la adenilato ciclasa por acción del iodolípido (Panneels et al., 1994b). Resultados previos *in vivo* obtenidos en el laboratorio han demostrado que el 2-IHDA posee capacidad antibociogena, disminuyendo los niveles intracelulares de AMPc y reduciendo el número de células así como también el alto del epitelio glandular (Thomasz et al., 2010a). Asimismo ha sido demostrado que tiene efectos antiproliferativos sobre células FRTL-5 a través de la inducción del arresto del ciclo celular e inducción de la apoptosis (Thomasz et al, 2015).

El presente trabajo de tesis tuvo por objetivo determinar si el 2-IHDA modula funciones de la célula tiroidea, particularmente sobre la maquinaria de síntesis de hormonas tiroideas. Por tanto se estudió el efecto que posee sobre NIS y la captación de yoduro,  $\text{Ca}^{2+}$  y generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la expresión de genes específicos de tiroides y sus proteínas así como también la participación de receptores nucleares de la familia de los PPARs.

Los datos observados a partir de los resultados obtenidos indican que tanto el KI como el 2-IHDA promueven la inhibición de la captación de yoduro. En este punto es destacable mencionar que el efecto del iodolípido es más potente que el de KI a igual dosis aplicada descartando que el efecto del iodolípido se deba al yodo liberado por una posible deshalogenación. Dicho resultado podría estar dado en parte por un incremento de eflujo del yodo, debido a que este efecto fue observado en tiempos cortos. Recientemente, Calil-Silveira et al., (2016) han publicado que el eflujo de yodo es incrementado

cuando células PPC13, similares a FRTL-5 son expuestas a dosis de 1mM de KI. La proteína Pendrina podría tener parte en este efecto ya que se observó un aumento de la proteína, además de su inserción en membrana. En igual sentido hemos observado un aumento de los niveles de RNAm de *Pds* (qRT-PCR) y aumento de la actividad promotora. No obstante, el efecto observado sobre el eflujo del yoduro por parte del 2-IHDA no permite explicar la pronunciada inhibición que sufre la captación del halógeno, lo cual indica un efecto sobre la proteína de NIS como fue previamente sugerido por Grollman et al. (1986). Aún hoy el mecanismo de acción del yodo sobre NIS no está totalmente dilucidado. Evidencias contrapuestas han sido publicadas acerca del efecto del yoduro sobre los niveles de RNAm de *Nis*. Huang et al. (2011) observaron estimulación, otros no encontraron efectos (Eng et al., 2001; Leoni et al., 2011; Arriagada et al., 2015) y la mayoría de los autores determinaron un efecto inhibitorio (Uyttersprot et al., 1997; Eng et al., 1999; Spitzweg et al., 1999; Maier et al., 2007; Leoni et al., 2008; Fiore et al., 2009; Thomasz et al., 2010b; Serrano-Nascimento et al., 2012, 2016). La discrepancia en los resultados podría deberse a los diferentes modelos utilizados, a las dosis de yodo aplicadas o a la diferencia en la regulación del gen *Nis* en especies diferentes.

Un estudio realizado por Scipioni et al. (2007) en Italia demostró que *Nis* está regulado por la ingesta de yodo, ya que los niveles de TSH en suero no varían entre pacientes con una dieta suficiente y otros con dieta deficiente en yodo, indicando una acción directa del halógeno. Nosotros observamos que *Nis* es modulado negativamente a nivel del RNAm por 2-IHDA y en menor medida

por KI. Esta disminución posee su origen a nivel transcripcional debido a que se determinó una disminución de la actividad del promotor de *Nis* y un decaimiento de la interacción de los factores de transcripción con el DNA, principalmente Pax8.

Nuestros resultados se encuentran en concordancia con el efecto observado para altas dosis de yoduro y la supresión de la expresión del gen *Nis* causada por la disminución de la interacción de los factores de transcripción con la región promotora de *Nis* (Suzuki et al, 2010; Serrano-Nascimento et al., 2016). in embargo estos resultados se contradicen con autores que no han observado efectos en la interacción entre Pax8 y la región promotora de *Nis* (Leoni et al., 2011). Debe remarcarse que nuestros efectos han sido principalmente obtenidos con el 2-IHDA y que la discrepancia de resultados se puede deber a lo explicado con antelación, debido a que se utilizaron diferentes metodologías, pero también porque las FRTL-5 y las PCCL3 no son tan eficientes como los sistemas de estudio *in vivo* en lo que respecta a la organización del yoduro, por lo tanto se pueden llegar a perder los efectos del halógeno.

Ante los resultados obtenidos en relación a la disminución de la captación de yodo y consecuente bloqueo de la acción de la TSH, una pregunta que nos surgió es si el efecto inhibitorio del 2-IHDA sobre el transporte de membrana es puntual sobre *Nis* o generalizado. Ha sido demostrado que el yoduro no solo inhibe su propio transporte a través de la membrana plasmática sino que también lo hace con otros metabolitos (Filetti et al., 1986). Además,

resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que otros tres compuestos: el ácido libre (ácido 14-iodo-15-hydroxy-6-eicosatrienoico), la omega lactona (IL- ) (Krawiec et al. 1991) y IL- (Thomasz et al., 2010b) mimetizan la acción del yoduro sobre la captación de 2-desoxi-D-glucosa. Por lo tanto nos propusimos estudiar la acción del 2-IHDA sobre la captación de  $^3\text{H}$ -DOG. Los resultados demostraron que el 2-IHDA influye sobre la captación de este compuesto y nos permite determinar que posee efectos adicionales sobre la permeabilidad de la membrana.

La síntesis de hormonas tiroideas tiene lugar cuando el yoduro es oxidado y se une a la Tg, este proceso es catalizado por la TPO utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sustrato. Las Dual oxidasas (DUOX1 y DUOX2) que pertenecen a la familia de las NADPH oxidasas son las responsables de la generación del peroxido de hidrógeno. La TSH activa este proceso a través de la activación intracelular de la vía del  $\text{Ca}^{2+}$ . Un exceso de yoduro inhibe su propia oxidación y unión a las proteínas, así como también promueve la inhibición en la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por parte de las proteínas DUOXs (Corvilain et al., 1994; Morand et al., 2003). Se ha observado que la actividad oxidasa de las NADPH es muy baja en tiroides de pacientes que padecen bocio difuso y que han sido tratados con yodo antes de la cirugía (Cardoso et al 2001). En cortes de tiroides porcinas el 2-IHDA posee la capacidad de inhibir a DUOX1 y DUOX2 (Ohayon et al., 1994), y en cultivos de células de tiroides de perro el 2-IHDA decrece la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Panneels et al., 1994a). Nosotros hemos observado un efecto dual sobre *Duox2* por parte del 2-IHDA en concordancia con los resultados de Corvilain et al., (2000), donde a bajas concentraciones se



produce un estímulo en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y a altas dosis se promueve una fuerte inhibición, demostrando de esta manera que el 2-IHDA es el mediador del efecto Wolff- Chaikoff. Estos efectos son mediados por la DUOX2 ya que solo se observó una inhibición de la DUOX1. Debe remarcarse que DUOX2 posee el rol principal en la iodación de Tg como ha sido demostrado en pacientes que sufren de organificación parcial del yodo, debido a mutaciones bialélicas en el gen de *Duox2* (Moreno et al., 2002; Varela et al., 2006).

Otro gen altamente regulado por el 2-IHDA es *Tpo*; se ha observado que su expresión esta altamente modulada por el yoduro a concentraciones altas y fisiológicas tanto *in vitro* (Morand et al., 2003; Leoni et al., 2008; Serrano-Nascimento et al., 2016) como *in vivo* (Uyttersprot et al., 1997; Eng et al., 1999; Maier et al., 2007).

Respecto a *Tg*, otro gen regulado hacia abajo por el 2-IHDA, cuando es expuesto a altas dosis de yodo su expresión se encuentra disminuida en células PCCL3 (Leoni et al., 2008; Serrano-Nascimento et al., 2016) y tambien en folículos bovinos (Thomasz et al., 2010); por el contrario otros autores no encontraron efectos (Pregliasco et al., 1996; Uyttersprot et al., 1997; Suzuki et al., 1998; Eng et al., 1999; Kostic et al., 2009).

Como la expresión transcripcional de estos genes está regulada por varios factores de transcripción tiroideos, incluyendo Pax8, Nkx2-1 y Foxe1; los cuales son críticos para la función de la tiroides (Fernandez et al., 2015), se analizó el efecto del iodolípido en la expresión de estos factores de

transcripción. El 2-IHDA promovió una disminución de la expresión de *Pax8* y *Foxe1*. Por el contrario la expresión de *Nkx2-1* fue estimulada por el iodolípido e inhibida por la TSH. Está bien documentado el efecto estimulatorio de la TSH sobre la expresión de *Tg*, *Tpo*, *Nis* y *Duox2*, pero el rol en la regulación de la expresión de los factores de transcripción tiroideos específicos permanece aun en estudio. Mientras la expresión de *Pax8* y *Foxe1* es estimulada por la vía TSH/AMPC (Van Renterghem et al., 1996; Ortiz et al., 1997), la modulación de *Nkx2-1* parecería ser diferente. En células FRTL-5 la expresión está modulada negativamente por la adición de TSH como así también por forskolina (Shimura et al., 1994). Por el contrario Van Renterghem et al., (1995) no encontraron efectos en cultivos primarios de tirocitos caninos. Es más, en una línea obtenida de células FRTL-5 que expresa de manera constitutiva diferentes niveles de *Ras*; *Pax8* y *Foxe1* fueron inhibidos significativamente mientras que *Nkx2-1* fue afectado en menor medida (De Vita et al., 2005). Esto podría explicar las diferentes maneras de acción del 2-IHDA sobre la regulación de los factores de transcripción. En lo que respecta a la interacción de los factores de transcripción con las regiones promotoras de los genes estudiados, el 2-IHDA promueve una reducción de la unión del *Pax8* al DNA, resultado congruente con los obtenidos por Serrano-Nascimento et al., (2016), donde demuestra una disminución de la interacción de este y el DNA sobre la región potenciadora de *Nis* cuando aplica yoduro como tratamiento; sin embargo, Leoni et al., (2011) no observaron ningún efecto. Debe ser considerado que *Pax-8* no solo es uno de los factores principales de la expresión de *Nis* (Onho et al., 1999) sino que tambien lo es de los otros genes aquí estudiados (D'Andrea et al., 2006;

Fernández et al., 2015). Contrariamente el 2-IHDA causa una estimulación de la unión de Nkx2-1 y Foxe1 al DNA de las regiones estudiadas. El aumento en la interacción de Nkx2-1 se encuentra en línea con lo observado para la estimulación de la expresión de dicho gen y sorprendentemente en contraposición Foxe1 fue estimulado en su unión al DNA pero inhibido en su expresión. Fue demostrado que a pesar de que Foxe1 es estimulado por TSH, su expresión se correlaciona de manera inversa con la diferenciación de células foliculares tiroideas y además interfiere con la activación de Nkx2-1 y Pax-8 sobre los promotores de *Tg*, *Tpo* y *Duox-2*, pero no en el promotor de *Nis*, en concordancia con lo observado para 2-IHDA (Zannini et al., 1997; Perrone et al., 2000; Fernández et al., 2015). Otra explicación es que la interacción del factor Foxe1 con el DNA es necesario para promover la interacción de otro factor represor inducido por el 2-IHDA.

Para descartar la posibilidad de que los resultados obtenidos por el 2-IHDA se hubiesen debido a la deshalogenación del iodolípido y consecuente liberación de yoduro, se intentó utilizar MMI y PTU como agentes para el bloqueo de la tiroperoxidasa y oxidación del yodo respectivamente. Desafortunadamente no hemos podido utilizar estas drogas ya que *a priori* poseen efectos sobre los niveles de expresión de algunos de los genes estudiados (datos no mostrados). Ha sido demostrado que el MMI puede actuar en el control de la función tiroidea por inhibición de la generación de AMPc (Korytkowski & Cooper, 1992). Además, PTU induce un aumento en la expresión de *Nis* y la captación de yoduro (Sue et al., 2012), aumento de la expresión de *Tpo* y *Tg* en células (Leer et al., 1991a Leer et al., 1991 b). Por

otra parte, tal lo comentado, se observó que el 2-IHDA posee un efecto más pronunciado que el yoduro a iguales dosis. Más aun, se observa que en los períodos ensayados el iodolípido es estable según los análisis de infrarrojo y HPLC así como por espectrometría de masa. Por consiguiente, se concluye que los resultados obtenidos son consecuencia del efecto directo del iodolípido.

Dado que los ácidos grasos pueden unirse a receptores del tipo de los PPARs y que la iodolactona podría ejercer un efecto antineoplásico en el cáncer de mama a través de los PPARs (Nuñez Anita et al., 2009), nos propusimos estudiar el rol de estos receptores como mediadores de la acción del 2-IHDA. Poco se sabe sobre el rol de los PPARs en la función tiroidea normal. Poncin et al., (2008) demostraron la presencia de PPAR gamma en tiroides de rata, pero su presencia no estaba involucrada en la respuesta anti inflamatoria del 15dPGJ2 un ligando endógeno del PPAR gamma. Por otra parte Werion et al., (2016) observaron que la pioglitazona, un activador de PPAR gamma estimula la síntesis de caveolina, proteína indispensable para la síntesis de hormonas tiroideas. Asimismo estimula la síntesis de TPO y las DUOX.

Uno de los eventos moleculares asociados al cáncer folicular de tiroides es un rearrreglo cromosomal que da como resultado una fusión entre los genes *Pax8* y *PPAR gamma*. Kroll et al., (2000) demostraron que en un subset de muestras de carcinoma folicular de tiroides existe una translocación de un segmento del cromosoma 2 (q13) al cromosoma tres (p25). El resultado es la fusión de la región promotora y hasta los exones 6/7 del factor de transcripción

*Pax8* al exón 1 de *PPAR gamma1*. Esto genera un rearreglo cromosómico donde la proteína Pax8/PPARg esta gobernada por la actividad transcripcional de la región promotora de *Pax8* y funcionalmente se comporta como un dominante negativo de PPAR gamma que no posee respuesta a la acción de las tiazolidinedionas. Es por ello que la mayoría de los trabajos sobre PPAR están hechos en muestras o líneas celulares tumorales.

Au et al. (2006) determinaron que los rearreglos Pax8-PPAR gamma promueven un estímulo de la transcripción de los genes *Nis* y *Tpo*, mientras que en *Tg* la disminuye. Dicha fusión actuaría como un inhibidor dominante de la acción de PPAR gamma debido a que además promueve la proliferación celular de FRTL-5, Hela, Nthy-ori3-1 y tirocitos humanos primarios (Au et al 2006; Powell et al., 2004; Espadinha et al., 2007; Lui et al., 2008 y Eberhardt 2010). En igual sentido, Gentilcore et al., (2013) al tratar células FRTL-5 con el antagonista de PPAR gamma, Bisfenol A, determinó que se promueve un aumento de *Nis* a nivel transcripcional y que dicho aumento es dosis dependiente.

Tal lo comentado, Au et al. (2006) han comunicado que la sobre expresión del constructo de fusión Pax8/PPARg generó incrementos significativas en los niveles de actividad del promotor *Nis* y *Tpo*, aun en presencia de la sobre expresión de Pax8 y Nkx2-1. Por el contrario cuando analizaron los niveles de actividad del promotor de *Tg*, observaron una disminución significativa en todas las condiciones ensayadas.

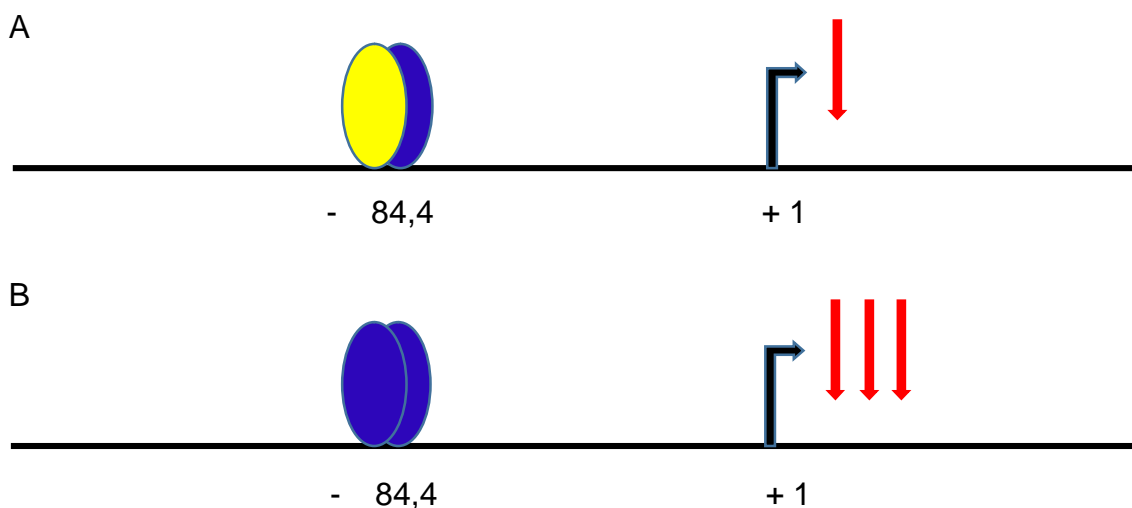
Hemos podido demostrar que la TSH inhibe la actividad tanto de PPAR alfa como gamma. Por el contrario el 2-IHDA aumenta la actividad de los PPARs siendo el efecto sobre el subtipo alfa mayor. Como era de esperar el fenofibrato activa a la construcción quimérica reportera de la actividad alfa mientras que la rosiglitazona lo hace sobre la gamma. Sin embargo el fenofibrato tiene acción sobre la gamma aunque con mucha menor actividad que la rosiglitazona. Así mismo se ha determinado que existen sitios de unión conservados en los genes de *Nis*, *Tg*, *Tpo* y en los factores de transcripción *Pax8*, *Nkx2-1* y *Foxe1* para estos receptores nucleares.

Sin embargo al analizar la expresión de los PPARs, sorpresivamente observamos un efecto inverso. La TSH estimula la expresión de ambas isoformas mientras que el idolípido las inhibe. No tenemos una explicación al respecto. El fenofibrato, agonista del PPAR alfa, inhibe ambas isoformas mientras que la rosiglitazona, agonista del PPAR gamma, no tiene efecto alguno. El agregado de los RNAs de interferencia disminuye, como era de esperar, la expresión de los respectivos PPARs; sin embargo no logra una inhibición completa.

Cuando analizamos el efecto de los PPARs y la interacción con el idolípido sobre los diferentes genes tiroideo-específicos hemos observado que varían según el gen estudiado.

El fenofibrato y la rosiglitazona, inhiben la expresión de *Nis*. La adición de los siRNAs tiene un efecto dispar. Mientras que la inhibición de PPAR alfa por parte del correspondiente siRNA no promueve un aumento del RNAm de

*Nis* sino una pronunciada inhibición al igual que la captación de yoduro, la adición del siRNA para PPAR gamma no provoca inhibición ni en la transcripción ni en la captación. Es de notar que la adición del siRNA alfa potencia la acción de la rosiglitazona, agonista gamma. Esto se podría explicar de la siguiente manera: el gen *Nis* está fuertemente regulado por Pax8; en el promotor de *Pax8*, tal lo comentado, hay sitios para PPAR alfa y gamma ambos superponiéndose (Figura 34A). Sin embargo, la activación de la isoforma alfa no produce efecto alguno mientras que sí lo hace la isoforma gamma. La inhibición de PPAR alfa permite la acción de la otra isoforma con el consiguiente efecto inhibitorio (Figura 34B). Es de hacer notar que hubiese sido interesante poder disponer de resultados obtenidos con el agregado de los dos siRNAs a la vez pero el efecto fue sumamente nocivo para las células.



**Figura 34:** representación esquemática del sitio protegido V de la secuencia *Cns87* de *Pax8* donde los sitios para PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  se superponen. La acción por parte del PPAR $\gamma$  en este sitio es de inhibición.

En lo que respecta a la acción del 2-IHDA, los resultados obtenidos con el análisis por ChIP mostraron que el 2-IHDA provoca un aumento en la interacción tanto de PPAR alfa y gamma sobre los sitios presentes en la región promotora de *Nis*. La acción del siRNA para PPAR gamma no logró rescatar a *Nis* de la acción del 2-IHDA pero en cambio se observó un rescate parcial aunque significativo sobre la captación de iodo. Tal lo mencionado, la regulación en la captación de iodo puede deberse no sólo a través de la regulación de la transcripción de *Nis* sino también a efectos post traduccionales.

En relación a PPAR alfa hemos observado similares niveles en el bloqueo de acción del iodolípido con o sin siRNA. Podemos concluir por lo tanto que si bien las dos isoformas regulan negativamente a *Nis*, el mayor efecto es a través de PPAR gamma. 2-IHDA no actuaría a través de esta isoforma, aunque el hecho de que la acción de los siRNAs deja un nivel residual de alrededor del 50% no nos permite sacar conclusiones firmes. Respecto al PPAR alfa como intermediario de la acción de la acción del iodolípido no podemos sacar conclusiones al observar efectos directos del siRNA para esta isoforma.

En lo que respecta al gen de *Tpo*, existe una contraposición. Mientras el agonista de la variante alfa provoca una disminución significativa en su transcripción a dosis más altas, la rosiglitazona promueve una tendencia al aumento aunque no significativa, también a las dosis más altas. Cabe destacar que en la región promotora de *Tpo* no hay sitios para PPAR alfa por lo menos



en hasta – 2000pb. La activación del PPAR gamma por parte de rosiglitazona en presencia del siRNA para PPAR alfa, promueve una recuperación de los niveles de RNAm; estos resultados y los anteriores indicarían que la acción del PPAR gamma sobre la región promotora de *Tpo* es estimulatoria. En igual sentido, Gentilcore et al. (2013) en sus ensayos con bisfenol A determinan que la utilización de este antagonista de PPAR gamma promueve una inhibición de *Tpo* mientras que Werion et al. (2016) observaron que la pioglitazona, agonista, estimula la síntesis de TPO tal como fuera comentado.

Es destacable observar que el silenciamiento de PPAR alfa promueve una significativa disminución de los niveles de RNAm de *Tpo*. Nuevamente, al ser Pax8 un factor de transcripción importante para *Tpo*, al igual que *Nis* la inhibición de PPARGa permitiría la acción de la otra isoforma. El análisis por Chip mostró que el 2-IHDA provoca un aumento en la interacción del PPAR gamma sobre los dos sitios presentes en la región promotora de *Tpo*. Esto se contradice con la ausencia de acción del PPAR gamma. Podríamos concluir por lo tanto que el iodolípido no actúa en la inhibición de la expresión de *Tpo* a través de PPAR gamma. En cuanto a la participación de PPAR alfa no podemos sacar ninguna conclusión al tener el siRNA para dicha isoforma un efecto *per se*.

Respecto a *Tg* y en total concordancia con lo demostrado con Au et al. (2006) para PPAR gamma, ambos agonistas ejercen un efecto inhibitorio. Asimismo Gentilcore et al. (2013) a través de la utilización del antagonista de PPAR gamma, bisfenol A, observó un aumento de la expresión de *Tg* y

actividad del promotor proximal. Cabe destacar que al igual que en el caso anterior, no hay sitios para PPAR alfa en la región promotora de *Tg* analizada. Nuevamente se repite lo observado para *Nis* y *Tpo*. Podríamos concluir que el 2-IHDA inhibiría la transcripción de *Tg* a través de PPAR gamma, puesto que dicha inhibición es revertida por el silenciamiento de este subtipo.

En lo que respecta a los factores de transcripción, tal lo comentado el Pax 8 está regulado principalmente por la isoforma gamma. Nitsch et al. (2010) demostró que dentro del *enhancer* existen cinco sitios activos en los que se podrían unir factores de transcripción (protegidos para la acción de DNAsa), donde a dos de ellos se une Nkx2-1. Nosotros hemos determinado a través de la aplicación PROMO 3.0, que sobre el sitio que ellos denominaron número cinco (FT-V) existe una secuencia de unión para PPAR alfa superpuesta con PPAR gamma y a través de ChIP observamos que PPAR gamma se asocia principalmente al DNA. En relación a estos resultados, Gentilcore et al. (2013) cuando analizaron la acción del Bisfenol A, observaron que se promueve un aumento de la transcripción de *Pax8*. La activación de PPAR alfa, por parte de su agonista no posee acción por si solo sobre *Pax8* al no observarse ningún efecto transcripcional. Estos resultados en igual sentido que Au et al. (2006), Espadinha et al. (2007) y Eberhardt et al. (2010) y Gentilcore et al. (2013) demuestran la importancia que posee la modulación de PPAR gamma sobre *Pax8*, aunque estos efectos fueron demostrados con el rearreglo Pax8/PPARg.

La acción del 2-IHDA es de un aumento de unión al DNA tanto de PPAR gamma como de Nkx2-1 y esto se encuentra relacionado de manera directa

con la inhibición del Pax 8. Al igual que *Nis*, cuando se silencia *Ppar gamma* se promueve un aumento de la expresión de *Pax8* y se bloquea de manera parcial la acción del 2-IHDA.

Los datos obtenidos demuestran que de los cuatro sitios identificados para *Foxe1*, al menos los de unión para PPAR alfa son los responsables de la inhibición que sufre este a nivel del promotor y de la transcripción. El silenciamiento de *Ppar alfa* junto a la adición del agonista de PPAR gamma promovió un aumento de la expresión de *Foxe1*; esto se encuentra en línea con lo observado para *Tpo* donde supone que el sitio de unión para PPAR gamma actuaría modulando de manera positiva. En contraposición, Gentilcore et al. (2013) ha publicado que el Bisfenol A promueve un aumento de los niveles de RNAm de *Foxe1*. En lo que respecta al 2-IHDA, el silenciamiento parcial del *Ppar alfa* inhibe la acción del iodolípido mas no así el siRNA para *Ppar gamma*.

Respecto a *Nkx2-1* los resultados obtenidos permiten observar que el aumento promovido por el 2-IHDA a nivel transcripcional también es mimetizado por el agonista de PPAR gamma. Si bien hemos identificado dos sitios de unión de PPAR alfa en la región promotora de *Nkx2-1*, la acción de dicho factor de transcripción queda inconclusa. Como contra partida, la activación de PPAR gamma por su agonista y el silenciamiento desarrollado a través del siRNA permite determinar la acción de estímulo que éste posee sobre los niveles transcripcionales de *Nkx2-1*, sin embargo Gentilcore et al (2013) reportan un aumento de la expresión de *Nkx2-1* cuando se utiliza

Bisfenol A. El silenciamiento tanto del subtipo alfa como gamma promueve el bloqueo de acción del idolípido.

En estudios desarrollados en pacientes con diferentes tipos de cáncer de tiroides donde los mecanismos de autorregulación se encuentran descompensados, se ha observado que la utilización de agonistas para PPAR gamma promueve una disminución en los niveles de proliferación celular (Frohlich et al., 2005; Park et al 2005; Bonofiglio et al., 2008). Además de estos ensayos se ha observado que aquellos pacientes que poseían alto nivel de expresión de PPAR gamma al ser tratados con su agonista promovían una diferenciación celular al incrementarse los niveles de RNAm de *Nis* y aumento de la captación de Ioduro (Philips et al., 2004; Park et al., 2005, Tepmonkol et al., 2008). En igual sentido, en FRTL-5 al desarrollar un sistema descompensado a partir del silenciamiento de PPAR alfa observamos un aumento de la expresión de genes tiroideos como *Tpo* y *Foxe1* cuando se adicionó el agonista de PPAR gamma.

Por lo mencionado anteriormente es difícil obtener una conclusión firme sobre los efectos de los PPARs como intermediarios en la acción del 2-IHDA. El hecho de no poder llevar a cabo un silenciamiento total y observar efectos inesperados conducen a continuar profundizando estos estudios.

Como fuera mencionado en secciones anteriores acerca de la naturaleza del candidato propuesto como el elemento XI, ha sido éste el objetivo principal en lo extenso de este trabajo. Además de los iodolípidos, varios compuestos fueron postulados como mediadores, tales como la Tg y la T<sub>3</sub>. Con respecto la

a Tg se ha demostrado que inhibe la expresión de genes tiroides específicos, inclusive los factores de transcripción, pero al contrario del yoduro, la Tg promueve la proliferación celular y este efecto también se observa en células no tiroideas (Sellitti and Suzuki, 2014). Respecto de T<sub>3</sub>, existe poca evidencia donde se sugiere que la hormona tiroidea podría tener efecto directo sobre la proliferación celular (Juvenal et al., 1981; Pisarev, 1985; Akiguchi et al., 1992); TR puede ser considerado como supresor de tumores y con capacidad de modular la síntesis de HTs y proliferación celular (Akiguchi et al., 1992, Di Fulvio et al., 2000; Lu et al., 2012; Perri et al., 2014).

Dos iodolípidos, la IL- y el 2-IHDA fueron sugeridos como los operadores del mecanismo de autorregulación en la tiroides. La IL- no reproduce todos los efectos generados por el exceso de yodo. Este iodolípido ha inhibido el efecto estimulador del EGF en la proliferación de células de tiroides porcinas pero no reproduce los efectos de acumulación de AMPc por acción del KI (Dugrillon et al., 1990). En folículos porcinos (Gartner et al., 1997) y en estudios *in vivo* en ratas (Thomasz et al., 2010) la IL- no regula la síntesis de TGF- $\beta$  1 al contrario de la modulación positiva promovida por el exceso de yoduro (Yuasa et al. 1992, Cowin et al. 1992; Thomasz et al., 2010c). En folículos de tiroides bovinas no se observó ningún efecto sobre la expresión de genes cuando se lo midió por PCR semicuantitativa (Thomasz et al., 2010b) pero cuando se repitieron los ensayos cuantificando el RNAm por PCR en tiempo real se pudo observar una disminución de 3-10 cambios de magnitud (resultados no mostrados).

Los resultados presentados en este trabajo promueven y permiten identificar el rol del 2-IHDA como intermediario del iodo en los mecanismos de autorregulación de la glándula tiroidea y sin lugar a dudas en el efecto Wolff-Chaikoff. Sin embargo no se puede excluir la participación de la Tg, T<sub>3</sub> o de la IL- como parte de la identidad del elemento XI, y aún ante todo lo expuesto no se puede descartar la posibilidad de que más compuestos participen en el mecanismo de autorregulación.

## **Conclusiones**

El presente trabajo de tesis doctoral permite señalar las siguientes conclusiones acerca del estudio del rol del 2-IHDA en el mecanismo de autorregulación de la glándula tiroidea:

### **Conclusiones específicas:**

- ☑ El 2-IHDA disminuye la viabilidad celular.
- ☑ El 2-IHDA promueve una disminución de captación de yoduro y 2-desoxi-glucosa.
- ☑ El iodolípido genera un mayor eflujo de yoduro desde el citosol al medio exterior.
- ☑ El efecto del 2-IHDA sobre la producción de  $H_2O_2$  extracelular es dual, a bajas concentraciones lo incrementa y a altas lo inhibe.
- ☑ El iodolípido genera también un efecto dual en los niveles de calcio libre dentro del citosol y se relacionan de manera positiva y directa con los niveles de  $H_2O_2$  extracelular.
- ☑ El 2-IHDA promueve una disminución en los niveles proteicos de NIS, TPO, Tg, PAX8, FOXE1; un aumento en NKX2-1 y un efecto dual sobre DUOX2.
- ☑ El compuesto halogenado estudiado genera una disminución de los niveles de ARNm de *Nis*, *Tpo*, *Tg*, *Duox1*, *Pax8*, *Foxe1*, *Ppar alfa* y *Ppar gamma*; un aumento de *Pds* y *Nkx2-1* y un efecto dual sobre *Duox2*. Estos efectos están asociados a una menor o mayor actividad de sus respectivas regiones promotoras.

- ☑ El iodolípido disminuye los niveles de asociación entre el factor de transcripción PAX8 y el ADN de *Nis*, *Tpo* y *Tg*.
- ☑ El 2-IHDA aumenta la asociación del factor de transcripción NKX2-1 al ADN de las regiones promotoras de *Nis*, *Tpo* y *Tg*.
- ☑ El 2-IHDA genera un aumento de la asociación del factor de transcripción FOXE1 al ADN de las regiones promotoras de *Nis*, *Tpo* y *Tg* y un efecto dual sobre *Thox2*.
- ☑ El 2-IHDA ejerce un aumento de la actividad de PPAR alfa y PPAR gamma. Esto se correlaciona de manera positiva con la interacción que estos poseen sobre los sitios conservados definidos dentro de las regiones promotoras de *Nis*, *Tpo*, *Tg*, *Pax-8*, *Nkx2-1* y *Foxe1*.
- ☑ El silenciamiento parcial de PPAR gamma revierte los efectos ejercidos por el 2-IHDA sobre el gen de *Tg*.
- ☑ El aumento de actividad de PPAR gamma modula de manera positiva a *Foxe1* y actuaría junto a otro/s factor/res (reprimidos por PPAR alfa) en el aumento de expresión de *Nkx2-1*.
- ☑ PPAR gamma modula de manera negativa y directa a *Pax8*.
- ☑ El aumento de actividad de PPAR alfa modula de manera negativa a *Foxe1* y *Nis*.

**Conclusión general:**

El 2-IHDA desempeña un rol principal en el efecto Wolff-Chaikoff y en la identidad del elemento XI, modulando a través de los niveles de mensajeros secundarios (AMPc y  $\text{Ca}^{2+}$ ) y de la actividad de receptores nucleares (PPARs)



los niveles de transcripción de genes tiroideos y sus factores de transcripción canónicos.

## **Referencias Bibliográficas**

- Abramowicz MJ, Vassart G, Christophe D. Thyroid peroxidase gene promoters confers TSH responsiveness to heterologous reporter genes in transfection experiments. *Biochem Biophys Res Commun* 166, 1257-1264, 1990.
- Antonelli A, Ferrari S. M., Mancusi C., Mazzi V., Pupilli C., Centanni M., Ferri C., Ferrannini E., Fallahi P. Interferon-  $\gamma$  and  $\alpha$  induce CXCL11 secretion in human thyrocytes: Modulation by peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonists. *Immunobiol* 218, 690-695, 2013.
- Akiguchi I, Strauss K, Borges M, Silva JE, Moses AC. Thyroid hormone receptors and 3,5,3'-triiodothyronine biological effects in FRTL5 thyroid follicular cells. *Endocrinol* 131, 1279-1287, 1992.
- Arriagada AA, Albornoz E, Opazo MC, Becerra A, Vidal G, Fardella C, Michea L, Carrasco N, Simon F, Elorza AA, Bueno SM, Kalergis AM, Riedel CA. Excess iodide induces an acute inhibition of the sodium/iodide symporter in thyroid male rat cells by increasing reactive oxygen species. *Endocrinol* 156, 1540-1551, 2015.
- Arroyo-Helguera O, Anguiano B, Delgado G, Aceves C. Uptake and antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line. *Endocrinol Relat Cancer* 13, 1147-1158, 2006.
- Arvan P, Di Jeso B. Thyroglobulin structure, function and biosynthesis. En: Werner SC, Ingbar SH, Braverman LE, Utiger RD. Eds Werner & Ingbar's. *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 77-95, 2005.
- Au AYU, McBride C, Wilhelm KG, Koenig R, Speller B, Cheung L, Messina M, Wentworth J, Tasevski V, Learoyd D, Robinson BG, Clifton-Bligh RJ. PAX8-PPAR $\gamma$  disrupts normal pax-8 or PPAR $\gamma$  transcriptional function and stimulates follicular thyroid cell growth. *Endocrinol* 147, 367-376, 2006.

- Avbelj M, Tahirovic H, Debeljak M, Kusekova M, Toromanovic A, Krzisnik C, Battelino T. High prevalence of thyroid peroxidase gene mutations in patients with thyroid dysharmonogenesis. *Eur J Endocrinol* 156, 511-519, 2007.
- Aza-Blanc P, Di Lauro R, Santisteban P Identification of a cis-regulatory element and athyroid-specific nuclear factor mediating the hormonal regulation of rat thyroid peroxidase promoter activity. *Mol Endocrinol* 7, 1297-1306, 1993.
- Bianco AC, Kim BW. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 116, 2571-2579, 2006.
- Bohinski RJ, Di Lauro R, Whitsett JA. The lung-specific surfactant protein B gene promoter is a target for thyroid transcription factor 1 and hepatocyte nuclear factor 3, indicating common factors for organ-specific gene expression along the foregut axis. *Mol Cell Biol* 14, 5671-5681, 1994.
- Boeynaems JM y Hubbard WC. Transformation of arachidonic acid into iodolactone by rat thyroid. *J Biol Chem* 255, 9001-9004, 1980.
- Bonofiglio D, Qi H, Gabriele S, Catalano S, Aquila S, Belmonte M, Andó S. Peroxisome activated receptor y inhibits follicular and anaplastic thyroid carcinoma cells growth by upregulating p21 cip1/WAF1 gene in Sp1-dependent manner. *Endocrinol Related Cancer* 15, 545-557, 2008.
- Brancaccio A, Minichiello A, Grachtchouk M, Antonini D, Sheng H, Parlato R, Dathan N, Dlugosz A and Missero C, Requirement of the forkhead gene *Foxe1*, a target of sonic hedgehog signaling, in hair follicle morphogenesis. *Human Mol Genetics* 13, 2595-2606, 2004.
- Bruno MD, Bohinski RJ, Huelsman KM, Whitsett JA, Korfhagen TR. Lung cell-specific expression of the murine surfactant protein A (SP-A) gene is mediated by interactions between the SP-A promoter and thyroid transcription factor-1. *J Biol Chem* 270, 6531-6536, 1995.

- Buchholz DR, Paul BD, Fu L, Shi YB. Molecular and developmental analyses of thyroid hormone receptor function in *Xenopus laevis*, the African clawed frog. *Gen Comp Endocrinol*, 145, 1-19, 2006.
- Burns KA & Vanden Heuvel JP. Modulation of PPAR via phosphorylation. *Biochem Biophys Acta* 1771, 952-960, 2007.
- Cahmann HJ, Pommier J, Nunez J. Spatial requirement for coupling of iodotyrosine residues to form thyroid hormone. *PNAS*. 74, 5333-5335, 1997.
- Calil-Silveira J, Serrano-Nascimento C, Kopp P, Nunes MT. Iodide excess regulates its own efflux: a possible involvement of pendrin. *Am J Physiol Cell Physiol* 310, 576-582, 2016.
- Cardoso LC, Martins DCL, Figueiredo MDL, Rosenthal D, Vaisman M, Violante AHD, Carvalho DP.  $\text{Ca}^{2+}$ /nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent  $\text{H}_2\text{O}_2$  generation is inhibited by iodide in human thyroids. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 4339-4343, 2001.
- Chazenbalk GD, Pisarev MA, Kraviec L, Juvenal GJ, Burton G, Valsecchi RM. In vitro inhibitory effects of an iodinated derivate of arachidonic acid on calf thyroid. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* 34, 367-373, 1984.
- Chazenbalk GD, Valsecchi RM, Kraviec L, burton G, Juvenal GJ, MOnTeagudo E, Chester HA, Pisarev Ma. Thyroid autoregulation inhibitory effects of iodinated derivatives of arachidonic acid in iodine metabolism. *Prostaglandins* 36, 163-172, 1988.
- Cheng Q, Smith EE, Liu F, Gentle A, Hooper MJ, Anderson TA. Effects of perchlorate on sodium-iodide symporter and pendrin gene expression in deer mice. *Environ Toxicol* 22, 390-398, 2007.
- Chun JT, Di Dato V, D'Andrea B, Zannini M, Di Lauro R. The CRE-like element inside the 5'-upstream region of the rat sodium/iodide symporter gene interacts with diverse classes of b-Zip molecules that regulate transcriptional activities through strong synergy with Pax-8. *Mol Endocrinol* 18, 2817-2829, 2004.

- Christophe-Hobertus C & Christophe D. Delimitation and functional characterization of the bidirectional THOX–DUOXA promoter regions in thyrocytes. *Mol Cell Endocrinol* 317, 161-167, 2010.
- Cochaux P, Van Sande J, Swillens S, Dumont JE. Iodide-induced inhibition of adenylate cyclase activity in horse and dog thyroid. *Eur J Biochem* 170, 435-442, 1987.
- Corvilain B, Laurent E, Lecomte M, Vansande J, Dumont JE. Role of the cyclic Adenosine 3'-5' monophosphate and the phosphatidylinositol-Ca<sup>2+</sup> cascades in mediating the effects of thyrotropin and iodide on hormone Synthesis and Secretion in Human thyroid slices. *J Clin Endocrinol* 79, 152-159, 1994.
- Corvilain B, Collyn L, Van Sande J, Dumont J. E. Stimulation By Iodide Of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Generation In Thyroid Slices From Several Species. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278, 692-699, 2000.
- Costamagna E, García B, Santisteban P. The functional interaction between the paired domain transcription factor Pax-8 and Smad3 is involved in transforming growth factor- $\beta$  repression of sodium/iodide symporter gene. *J Biol Chem* 279, 3439-3446, 2004.
- Cowin AJ, Davis JRE, Bidey SP. Transforming growth factor  $\beta$  1 production in porcine thyroid follicular cells: regulation by intrathyroidal organic iodine. *J Mol Endocrinol* 9, 197-205, 1992.
- Cuesta I, Zaret KS, Santisteban P. The forkhead factor FoxE1 binds to the thyroperoxidase promoter during thyroid cell differentiation and modifies compacted chromatin structure. *Mol Cell Biol* 27, 7302-7314, 2007.
- Damante G, Teel G, Di Lauro R. A unique combination of transcription factors controls differentiation of thyroid cells. *Progress in Nucleic Acid Research. Mol Biol* 66, 307-356, 2001.
- D'Andrea B, Iacone R, Di Palma T, Nitsch R, Baratta MG, Nitsch L, Di Lauro R, Zannini M. Functional inactivation of the transcription factor Pax8 through oligomerization chain reaction. *Mol Endocrinol* 20, 1810-1824, 2006.

- Das B, Cai L, Carter MG et al. Gene expression changes at metamorphosis induced by thyroid hormone in *Xenopus laevis* tadpoles. *Dev Biol* 291, 342-355, 2006.
- Dathan N, Parlato R, Rosica A, De Felice M, Di Lauro R. Distribution of the *tif2/foxe1* gene product is consistent with an important role in the development of foregut endoderm, palate, and hair. *Dev Dyn* 224, 450-456, 2002.
- De Deken X, Wang D, Many M-C, Costagliola S, Libert F, Vassart G, Dumont JE, Miot F. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem* 275, 23227–23233, 2000.
- De Felice M, Ovitt C, Biffali E, Rodriguez-Mallon A, Arra C, Anastassiadis K, Macchia PE, Mattei MG, Mariano A, Scholer H, Macchia V, Di Lauro R. A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nat Genet* 19, 395-398, 1998.
- Degroot LJ & Greer MA. The effect of stable iodide on thyroid secretion in man
- *Metabolism* 5, 682-696, 1956.
- De Leo R, Miccadei S, Zammarchi E, Civitareale D. Role for p300 in Pax 8 induction of thyroperoxidase gene expression. *J Biol Chem* 275, 34100-34105, 2000.
- Dème D, Doussiere J, De Sandro V, Dupuy C, Pommier J, Virion A The  $\text{Ca}^{2+}$ /NADPH-dependent  $\text{H}_2\text{O}_2$  generator in thyroid plasma membrane: inhibition by diphenyleneiodonium. *Biochem J* 301, 75-78, 1994.
- Dentice M, Luongo C, Elefante A, Ambrosio R, Salzano S, Zannini M, Nitsch R, Di Lauro R, Rossi G, Fenzi G, Salvatore D. Pendrin Is a Novel In Vivo Downstream Target Gene of the TTF-1/Nkx-2.1 Homeodomain Transcription Factor in Differentiated Thyroid Cells. *Mol Cell Biol* 25, 10171-10182, 2005.

- Derwahl M, Seto P, Rapoport B. Complete nucleotide sequence of the cDNA for thyroid peroxidase in FRTL5 rat thyroid cells. *Nucleic Acids Res* 17, 83-90, 1989.
- De Vita G, Bauer L, Correa da Costa VM, De Felice M, Baratta MG, De Menna M, Di Lauro R. Dose-dependent inhibition of thyroid differentiation by Ras oncogenes. *Mol Endocrinol* 19, 76-89, 2005.
- Di Fulvio M, Coleoni AH, Pellizas CG, Masini-Repiso AM. Tri-iodothyronine induces proliferation in cultured bovine thyroid cells: evidence for the involvement of epidermal growth factor-associated tyrosine kinase activity. *J Endocrinol* 166, 173-182, 2000.
- Di Gennaro, Spadaro O, Baratta MG, De Felice M, Di Lauro R. Functional analysis of the murine Pax-8 promoter reveals autoregulation and the presence of a novel thyroid-specific DNA- Binding Activity. *Thyroid* 23, 488-496, 2013.
- Di Palma T, Nitsch R, Mascia A, Nitsch L, Di Lauro R, Zannini ME. The paired domain containing factor Pax-8 and the homeodomain containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription. *J Biol Chem* 278, 3395-3402, 2003.
- Di Palma T, Conti A, Cistofaro T, Scala S, Nitsch Lucio, Zannini M. Identification of novel pax-8 targets in FRTL-5 Thyroid cells by gene silencing and expression microarray analysis. *Plos ONE* 6,251-262, 2011.
- Dohan O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev* 24, 48-77, 2003.
- Dohan O, Portulano C, Basquin C, Reyna-Neyra A, Amzel LM, Carrasco N. The Na<sup>+</sup>/I symporter (NIS) mediates electroneutral active transport of the environmental pollutant perchlorate. *PNAS* 104, 20250-20255, 2007.
- Dossena S, Vezzoli V, Cerutti N, Bazzini C, Tosco M, Sironi C, Rodighiero S, Meyer G, Fascio U, Furst J. Functional characterization of wild-type and a mutated form of SLC26A4 identified in a patient with Pendred syndrome. *Cell Physiol Biochem* 17, 245-256, 2006.

- Drechsel HFE. Contributions to the chemistry of some marine animals . II . About the axial skeleton of Gorgonia Cavolini. Z Biol 33-85, 1896.
- Dremier S, Phol V, Poteet-Smith C, Roger PP, Corbin J, Dokesland SO. Activation of cAMP-dependent kinase is required but not be sufficient to mimic AMP- dependent DNA synthesis and thyroglobulin expression in dog thyroid cells. Mol Cell Biol 17, 6717-6726, 1997.
- Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. Cell 68, 879-887, 1992.
- Dugrillon A, Bechtner G, Uedelhoven WM, Weber PC, Gartner R. Evidence that an iodolactone mediates the inhibitory effect of iodide on thyroid cell proliferation but not on adenosine 3',5'-monophosphate formation. Endocrinol 127, 337-343, 1990.
- Dugrillon A, Uedelhoven WM, Pisarev MA. Identifiacion of iodolactone in iodide treatment human goiter ant its inhibitory effect on proliferation on human thyroid follicles. Horm Met Res 26, 465-469, 1994.
- Dugrillon A y Gartner R. Delta-Iodolactones Decrease Epidermal Growth Factor-Induced Proliferation And Inositol-1,4,5-Trisphosphate Generation In Porcine Thyroid Follicles--A Possible Mechanism Of Growth Inhibition By Iodide. Eur J Endocrinol 132, 735-743, 1995.
- Dumont JE, Lamy F, Roger P, Maenhaut C. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. Physiol Rev 72, 667-697, 1992.
- Dumont, Opitz, Christophe, Vassart, Roger, Maenhaut. Chapter 1 – The Phylogeny, Ontogeny, Anatomy and Regulation of Iodine Metabolizing Thyroid. Thyroid disease manager 2015 ([www.thyroidmanager.org/chapter/ontogeny-anatomy-metabolism-and-physiology-of-the-thyroid/](http://www.thyroidmanager.org/chapter/ontogeny-anatomy-metabolism-and-physiology-of-the-thyroid/)).
- Dunn JT, Dunn AD Update on intrathyroidal iodine metabolism. Thyroid 11, 407- 414, 2001.



- Dupuy C, Virion A, Ohayon R. Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane. *J Biol Chem* 266, 3739-3743, 1991.
- Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noël-Hudson MS, Dème D, Virion A. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. *J Biol Chem* 274, 37265-37269, 1999.
- Dupuy C, Pomerance M, Ohayon R, Noël-Hudson MS, Dème D, Chaaaraoui M, Francon J, Virion A. Thyroid oxidase (THOX2) gene expression in the rat thyroid cell line FRTL-5. *Biochem Biophys Res Commun* 277, 287-292, 2000.
- Eagleson GW & McKewon BA. Changes in thyroid activity of *Ambystoma gracile* (Baird) during different larval, transforming and postmetamorphic phases. *Can J Zool* 56, 1377-1381, 1978.
- Eberhardt NL, Grebe S KG, McIver B, Reddi HV. The Role of PAX8/PPAR $\gamma$  fusion oncogene in the pathogenesis of follicular thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol* 321, 50-56, 2010.
- Eng PHK, Cardona GR, Fang SL. Escape from acute Wolf chaikoff effect associated with decreased in thyroid sodium iodide symporter gene, *Mol Endocrinol* 140, 3404-3411, 1999.
- Eng PH, Cardona GR, Previti MC, Chin WW, Braverman LE.,. Regulation of the sodium iodide symporter by iodide in FRTL-5 cells. *Eur J Endocrinol* 144, 139-144, 2001.
- El-Hassani RA, S Morand, Boucher JL, Frapart YM, Apostolou D, Agnandji D, Gnidehou S, Ohayon R, Noël-Hudson MS, Francon J, Lalaoui K, Virion A, Dupuy C. Dual Oxidase-2 Has an Intrinsic Ca<sup>2+</sup>-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating Activity. *J Biol Chem* 280, 30046-30054, 2005.
- Elstner E, Mueller C, Koshizuka K, Williamson EA, Park D, Asou H, Shintaku P, Said JW, Heber D, Koeffler HP. Ligands for peroxisome proliferators- activated- receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit

- growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *PNAS* 95, 8806-8811, 1998.
- Espadinha C, Cavaco BM, Leite V. Pax8PPAR $\gamma$  stimulates cell viability and modulates expression of thyroid specific genes in human thyroid cell line. *Thyroid* 17, 497-509, 2007.
  - Espadinha C, Pinto AE, Leite V. Underexpression of PPAR $\gamma$  is associated with aneuploidy and lower differentiation of thyroid tumours of follicular origin. *Oncology Reports* 22, 907-913, 2009.
  - Everett LA, Glaser B, Beck JC, Idol JR, Buchs A, Heyman M, Adawi F, Hazani E, Nassir E, Baxevas AD, Sheffield VC, Green ED. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet* 17, 411-422, 1997.
  - Everett LA & Green ED. A family of mammalian anion transporters and their involvement in human genetic diseases. *Hum Mol Genetics* 8, 1883-1891, 1999.
  - Fabbro D, Pellizzari L, Mercuri F, Tell G, Damante G. Pax-8 protein levels regulate thyroglobulin gene expression. *J Mol Endocrinol* 21, 347-354, 1998.
  - Fenton MS, Marion KM, Hershman JM. Identification of cyclic adenosine 3',5'- monophosphate response element modulator as an activator of the human sodium/iodide symporter upstream enhancer. *Endocrinol* 149, 2592-2606, 2008.
  - Fernández LP, López-Márquez A, Martínez AM, Gómez-López G, Santisteban P. New insights into FoxE1 functions: identification of direct FoxE1 targets in thyroid cells. *PLoS One* 8:e62849, 2013
  - Fernández LP, López-Márquez A, Santisteban P. Thyroid transcription factors in development, differentiation and disease. *Nat Rev Endocrinol* 11, 29-42, 2015.
  - Filetti S, Vetri M, Damante G, Belfiore A. Thyroid autoregulation: effect of iodine on glucose transport in cultured thyroid cells. *Endocrinol* 118, 1395-400, 1986.

- Fiore AP, Fuziwara CS, Kimura ET. High iodine concentration attenuates RET/PTC3 oncogene activation in thyroid follicular cells. *Thyroid* 19, 1249-1256, 2009.
- Francis-Lang H, Price M, Polycarpou-Schwarz M, Di Lauro R. Cell-type-specific expression of the rat thyroperoxidase promoter indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expression. *Mol Cell Biol* 12, 576-588, 1992.
- Frohlich E, Machicao F, Wahl R. Action of thiazolidinediones on differentiation, proliferation and apoptosis of normal and transformed thyrocytes in culture. *Endo Related Cancer* 12, 291-303, 2005.
- Gartner R, Dugrillon A, Bechtner G. Iodolipids and thyroid function and growth. En: the thyroid and Iodine. Eds Nauman J, Glinioer D, Braverman LE, Hostalek U. Merck European Thyroid Symposium, Stuttgart, New York, 19-27,1996.
- Gartner R, Schopohl D, Schaefer S, Dugrillon A, Erdmann A, Toda S, Bechtner G. Regulation of transforming growth factor 1 messenger ribonucleic acid expression in porcine thyroid follicles in vitro by growth factors, iodine and -iodolactone. *Thyroid* 7, 633-640, 1997.
- Gearing KL, Gottlicher M, teboul M, Widmark E, Gustafsson JA. Interaction of peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *PNAS* 90, 1440-1444, 1993.
- Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Resendez-Perez D, Affolter M, Otting G, Wüthrich K. Homeodomain-DNA Recognition. *Cell* 78, 211-223, 1994.
- Gentilcore D, Porreca I, Rizzo F, Ganbaatar E, Carchia E, Mallardo M, de Felice M, Ambrosino C. Bisphenol A interferes with thyroid specific gene expression. *Toxicology* 304, 21-31, 2013.
- Gerard C, Lefort A, Christophe D, Libert F, Van Sande J, Dumont JE. Control of thyroperoxidase and thyroglobulin transcription by cAMP: evidence for distinct regulatory mechanisms. *Mol Endocrinol* 3, 2110-2118, 1989.

- Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS, Zeold A, Bianco AC. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev* 29, 898-938, 2008.
- Gnidehou S, Caillou B, Talbot M, Ohayon R, Kaniewski J, Noel-Hudson MS, Morand S, Agnangji D, Sezan A, Courtin F, Virion A, Dupuy C. Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site. *Faseb J* 18, 1574-1576, 2004.
- Gottlicher M, Widmark E, Li Q, Gustafsson JA. Fatty acids activate a chimera of clofibrate acid-activated receptor and glucocorticoid receptor. *PNAS* 89, 4653-4657, 1992.
- Grau EG. Chapter 4 Thyroid hormones. *Vertebrate endocrinology: Fundamental and biochemical implications* 2, 1981.
- Grasberger H & Refetoff S. Identification of the maturation factor for dual oxidase. *J Biol Chem* 281, 18269-18272, 2006.
- Grasberger H, De Deken X, Miot F, Pohlenz J, Refetoff S. Missense mutations of dual oxidase 2 (DUOX2) implicated in congenital hypothyroidism have impaired trafficking in cells reconstituted with DUOX2 maturation factor. *Mol Endocrinol* 21, 1408-1421, 2007.
- Grollman EF, Smolar A, Ommaya A, Tombaccini D & Santisteban P. Iodine suppression of iodide uptake in FRTL-5 thyroid cells. *Endocrinol* 118, 2477-2482, 1986.
- Hatipoglu BA & Schneider AB. Selective endocytosis of thyroglobulin: a review of potential mechanisms for protecting newly synthesized molecules from premature degradation. *Biochim* 81, 549-555, 1999.
- Hamdan H, Liu H, Li C, Jones C, Lee M, deLemos R, Minoo P. Structure of the human Nkx2.1 gene. *Biochim Biophys Acta* 1396, 336-348, 1998.
- Helbing CC, Werry K, Crump D, Domanski D, Veldhoen N, Bailey CM. Expression profiles of novel thyroid hormone-responsive genes and proteins in the tail of *Xenopus laevis* tadpoles undergoing precocious metamorphosis. *Mol Endocrinol* 17, 1395-1409, 2003.

- Hihi AK, Michalik L, Wahli W. PPARs: transcripcional effectors of fatty acid and their derivatives. *Cell Mol Life Sci* 59, 790-798, 2002.
- Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman B. M. Inhibition of adipogenesis thorough MAP Kinase-mediated phosphorylation of PPAR gamma. *Science* 274, 2100-2103, 1996.
- Huang H, Shi Y, Lin L, Li X, Li L, Lin X, Xu D. Intracellular iodinated compounds affect sodium iodide symporter expression through TSH-mediated signaling pathways. *Mol Med Rep* 4, 77-80, 2011.
- Hulbert AJ. Thyroid hormones and their effects: a new perspective. *Biol Review* 75, 519-631, 2000.
- Ikeda K, Shaw-White JR, Wert SE, Whitsett JA Hepatocyte nuclear factor 3 activates transcription of thyroid transcription factor 1 in respiratory epithelial cells. *Mol Cell Biol* 16, 3626-3636, 1996.
- Issemann I & Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347, 645-650, 1990.
- Juge-Aubry CE, Hammar E, Siegrist-Kraiser C, Pernin A, Takeshita A, Chin W W. Regulation of the transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent transactivating domain. *J Biol Chem* 274, 10505-10510, 1999.
- Juvenal GJ, Pisarev M, Kleiman de Pisarev D, Altschuler N. Uptake, Metabolism and Action of Triiodothyronine in Calf Thyroid Slices. *Mol Cell Endocrinol* 22, 31-40, 1981.
- Juvenal GJ, Thomasz L, Oglio R, Perona M, Pisarev MA, Rossich L, Salvarredi L. Thyroid: iodine beyond the thyronines. *Curr Chem Biol* 5, 163-167, 2011.
- Kato Y, Ying H, Zhao L, Furuya F, Araki O, Willingham MC, Cheng SY. PPARc insufficiency promotes follicular thyroid carcinogenesis via activation of the nuclear factor-kB signaling pathway. *Oncogene* 25, 2736-2747, 2006.

- Kimura S, Kotani T, McBride OW, Umeki K, Hirai K, Nakayama T, Ohtaki S Human thyroid peroxidase: complete cDNA and protein sequence, chromosome mapping, and identification of two alternately spliced mRNAs. PNAS 84, 5555-5559, 1987.
- Kogai T, Taki K, Brent GA Enhancement of sodium/iodide symporter expression in thyroid and breast cancer. Endocr Relat Cancer 13, 797-826, 2006.
- Kopp P. Thyroid Hormone Biosynthesis. En: Braverman L, Utiger R eds. Werner & Ingbar's. The Thyroid a Fundamental and Clinical Text. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 52-77, 2005.
- Korytkowski M, Cooper D. Antithyroid drug effects on function and growth of FRTL-5 cells. Thyroid 2, 345-50, 1992.
- Kostic I, Toffoletto B, Fontanini E, Moretti M, Cesselli D, Beltrami CA, Ambesi Impiombato FS, Curcio F., 2009. Influence of iodide excess and interferon-gamma on human primary thyroid cell proliferation, thyroglobulin secretion, and intracellular adhesion molecule-1 and human leukocyte antigen-DR expression. Thyroid 19, 283-91
- Kota BP, Hsun-Wei Huang T, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. Pharma Research 51, 85-94, 2005.
- Kotani T, Umeki K, Yamamoto I, Takeuchi M, Takechi S, Nakayama T, Ohtaki S. Nucleotide sequence of the cDNA encoding mouse thyroid peroxidase. Gene 123, 289-290, 1993.
- Kotani T, Umeki K, Yamamoto I, Maesaka H, Tachibana K, Ohtaki S A novel mutation in the human thyroid peroxidase gene resulting in a total iodide organification defect. J Endocrinol 160, 267-273, 1999.
- Krawiec L, Chazenbalk GD, Puntarulo SA, Burton G, Boveris A, Valsecchi RM, Pisarev MA. The inhibition of PB125I formation in calf thyroid caused by 14-iodo-15-hydroxy-eicosatrienoic acid is due to decreased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> availability. Horm Metab Res 20, 86-90, 1988.
- Krawiec L, Chester HA, Bocanera LV, Pregliasco LB, Juvenal GJ, Pisarev MA. Thyroid autoregulation: evidence for an action of iodoarachidonates

- and iodide at the cell membrane level. *Horm Metab Res* 23, 321-325, 1991.
- Kraviec L, Cheser HA, Bocanera LV, Pregliasco LB, Juvenal GJ, Pisarev MA. Thyroid autoregulation: evidence for an action of iodoarachidonates and iodide at the cell membrane level. *Horm Metab Res* 23, 321-325, 1995.
  - Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma. *Science* 25, 1357-1360, 2000.
  - Langer R, Burzler C, Bechtner G, Gärtner R. Influence of iodide and iodolactones on thyroid apoptosis. Evidence that apoptosis induced by iodide is mediated by iodolactones in intact porcine thyroid follicles. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 111, 325-9, 2003.
  - Lapillonne H, Konopleva M, Tsao T, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  by a novel synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid induces growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res* 63, 5926-5939, 2003.
  - Larsen R, Davies T, Schlumberger M, Hay I. Iodine and the synthesis and secretion of Thyroid hormones. En: *Williams Textbook of Endocrinology*, Eds Kronenberg, S Melmed, K Polonsky, Larsen P, 11th ed. Philadelphia: Saunders, 301-305, 2008.
  - Laurent E, Mockel J, Takazawa K, Erneux C, Dumont JE. Stimulation of generation of inositol phosphates by carbamoylcholine and its inhibition by phorbol esters and iodide in dog thyroid cells. *Biochem J* 263, 795-801, 1989.
  - Laurberg P. Mechanisms governing the relative proportions of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine in thyroid secretion. *Metab* 33, 379-392, 1984.
  - Laurent E, Mockel J, Van Sande J, Graff I, Dumont JE. Dual activation by thyrotrophin of phospholipase C and cAMP cascades in human thyroid. *Mol Cell Endocrinol* 52, 273-276, 1987.

- Leer LM, Cammenga M, van der Vorm ER, de Vijlder JJ. Methimazole increases thyroid-specific mRNA concentration in human thyroid cells and FRTL-5 cells. *Mol Cell Endocrinol* 78, 221-228, 1991a.
- Leer LM, Cammenga M, De Vijlder JJ. Methimazole and propylthiouracil increase thyroglobulin gene expression in FRTL-5 cells. *Mol Cell Endocrinol*. 82, 25-30, 1991b.
- Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alfa (PPAR ) in the cellular fasting response: the PPAR -null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *PNAS* 96, 7473-7478, 1999.
- Leoni SG, Galante PA, Ricarte-Filho JC, Kimura ET. Differential gene expression analysis of iodide-treated rat thyroid follicular cell line PCCl3. *Genomics* 91, 356-366, 2008.
- Leoni SG, Kimura ET, Santisteban P, De la Vieja A. Regulation of thyroid oxidative state by thioredoxin reductase has a crucial role in thyroid responses to iodide excess. *Mol Endocrinol* 25, 1924-35, 2011.
- Lisi S, Segnani C, Mattii L, Botta R, Marcocci C, Dolfi A, McCluskey RT, Pinchera A, Bernardini N, Marino M. Thyroid dysfunction in megalin deficient mice. *Mol Cell Endocrinol* 236, 43-47, 2005.
- Lissitzky S, Gregoire J, Gregoire J, Limozin N. The presence and in vitro activity of free iodinated peptides in the thyroid gland of mammals and man. *Gen Comp Endocrinol* 1, 519-533, 1961.
- Livak KJ & Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the  $2^{-CT}$  Method. *Methods* 25, 402-408, 2001.
- Lonigro R, De Felice M, Biffali E, Macchia PE, Damante G, Asteria C, Di Lauro R. Expression of thyroid transcription factor 1 gene can be regulated at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cell Growth Differ* 7, 251-261, 1996.
- Lowry OH, Rosebroug NH, et al. protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275, 1951.



- Lu C, Zhu X, Willingham MC, Cheng SY. Activation of tumor cell proliferation by thyroid hormone in a mouse model of follicular thyroid carcinoma. *Oncogene* 31, 2007-2016, 2012.
- Lui WO, Zeng L, Rehmann, Deshpande S, Tretiakova M, Kaplan EL, Leibiger B, Enberg U, Hoog A, Larsson C, Kroll TG. CREB3L2-PPAR gamma fusion mutation identifies a thyroid signaling pathway regulated by intramembrane proteolysis. *Cancer Res* 68, 7156-7164, 2008.
- Maier J, van Steeg H, van Oostrom C, Paschke R, Weiss RE, Krohn K. Iodine deficiency activates antioxidant genes and causes DNA damage in the thyroid gland of rats and mice. *Biochim Biophys Acta* 1773, 990-999, 2007.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono F. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839, 1995.
- Marino M, McCluskey RT. Role of thyroglobulin endocytic pathways in the control of thyroid hormone release. *Am J Physiol Cell Physiol* 279, 1295-1306, 2000.
- Marians RC, Ng L, Blair HC, Unger P, Graves PN, Davies TF. Defining thyrotropin-independent and -independent steps of thyroid hormone synthesis by using thyrotropin receptor-null mice. *PNAS* 99, 15776-15781, 2002.
- Mascaro C, Acosta E, Ortiz JA, Marrero PF, Hergardt FG, Haro D. Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 273, 850-8563, 1998.
- Mascia A, Nitsch L, Di Lauro R & Zannini M. Hormonal control of the transcription factor Pax8 and its role in the regulation of thyroglobulin gene expression in thyroid cells. *J Endocrinol* 172, 163-176, 2002.
- McLachlan SM, Rapoport B. The molecular biology of thyroid peroxidase: cloning, expression and role as autoantigen in autoimmune thyroid disease. *Endocr Rev* 13, 192-206, 1992.

- Miller RT, Glover SE, Stewart WS, Corton JC, Popp JA, Cattley RC. Effect on the expression of *c-met*, *c-myc* and PPAR- $\alpha$  in liver and liver tumors from rats chronically exposed to the hepatocarcinogenic peroxisome proliferator WY-14, 643. *Carcinogenesis* 17, 1337-1341, 1996.
- Montesinos MM, Nicola JP, Nazar M, Peyret V, Lucero AM, Pellizas GC, Masini-Repiso AM. Nitric oxide-repressed Forkhead factor FoxE1 expression is involved in the inhibition of TSH-induced thyroid peroxidase levels. *Mol Cell Endocrinol* 420, 105-115, 2015.
- Morand S, Chaaraoui M, Kaniewski J, De Me D, Ohayon R E, Noel-Hudson M S, Virion A, Dupuy C. Effect Of Iodide On Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase Activity And Duox2 Protein Expression In Isolated Porcine Thyroid Follicles. *Endocrinol* 144, 1241-1248, 2003.
- Moreno JC, Bikker H, Kempers MJE, Van Trotsenburg P, Baas F, de Vijlder JJM, Vulsma T, Ris-Stalpers C. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *Engl J Med* 347,95-102, 2002.
- Moreno JC, Klootwijk W, van Toor H, Pinto G, D'Alessandro M, Leger A, Goudie D, Polak M, Gruters A, Visser TJ. Mutations In The Iodotyrosine Deiodinase Gene And Hypothyroidism. *N Engl J Med* 358, 1811-1818, 2008.
- Mori K, Mori M, Stone S, Braverman LE, DeVito WJ. Increased expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  and decreased expression of thyroglobulin and thyroid peroxidase mRNA levels in the thyroids of iodide-treated BB/Wor rats. *Eur J Endocrinol* 139, 539-545, 1998.
- Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, et al. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR. *Mol Cell* 1, 465-470, 1998.
- Muscella A., Marsigliante S., Verri T., Urso L., Dimitri C., Botta G., Paulmichl M., Beck-Peccoz P., Fugazzola L., Storelli C. PKC-E-Dependent Cytosol-To-Membrane Translocation Of Pendrin In Rat Thyroid PCCl3 Cells. *J Cell Physiol* 217, 103-112, 2008.

- Nakamura Y, Ohtaki, S, Makino R. Superoxide anion is the initial product in the hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in porcine thyroid plasma membrane. *J Biol Chem* 264, 4759-4761, 1989.
- Nava-Villalba M., Nuñez-Anita R.E., Bontempo A., Aceves C. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is crucial for antitumoral effects of 6-iodolactone. *Mol Cancer* 14, 168-179, 2015.
- Nazar M., Nicola J.P., Velez M.L, Pellizas C.G., Masini-Repiso A.M. Thyroid Peroxidase gene expression is induced by lipopolysaccharide involving Nuclear Factor (NF)- p65 subunit phosphorylation. *Endocrinol* 153, 6114-61125, 2012.
- Nicola JP, Nazar M, Mascanfroni ID, Pellizas CG, Masini-Repiso AM. NF-KB p65 subunit mediates lipopolysaccharide-induced sodium iodide symporter gene expression by involving functional interaction with paired domain transcription factor pax-8. *Mol Endocrinol* 24, 1846-1862, 2010.
- Nikitski A, Saenko V, Shimamura M, Nakashima M, Matsuse M, Suzuki K, Rogounovitch T, Bogdanoca T, Shibusawa N, Yamad M, Nagayama Y, Yamashita S, Mitsutake N. Targeted Foxe1 overexpression in Mouse thyroid causes the development of multinodular goiter but does not promote carcinogenesis. *Endocrinol* 157, 2182-2195, 2016.
- Nitsch R, Di Dato V, di Gennaro A, Cristofaro T, Abbondante S, De Felice M, Zannini M, Di Lauro R. Comparative genomics reveals a functional thyroid-specific element in the far upstream region of the pax-8 gene. *BMC Genomics* 11, 306-319, 2010.
- Nuñez-Anita RE, Arroyo-Helguera O, Cajero-Juárez M, López-Bojorquez L, Aceves C. A complex between 6-iodolactone and the peroxisome proliferator-activated receptor type gamma may mediate the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 89, 34-42, 2009.
- Oguchi H & Kimura S. Multiple transcripts encoded by the thyroid-specific enhancerbinding protein (T/EBP)/thyroid-specific transcription factor-1

- (TTF-1) gene: evidence of autoregulation. *Endocrinol* 139, 1999-2006, 1998.
- Ohayon R, Boeynems JM, Braekman JC, Van der Bergen H, Gorin Y, Virion A. Inhibition of thyroid NADPH oxidase by 2-iodohexadecanal in a cell-free system. *Mol Cell Endocrinol* 99, 133-141, 1994.
  - Ohno M, Zannini M, Levy O, Carrasco N, di Lauro R: The paired-domain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroidspecific and cyclic-AMP-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 19, 2051-2060, 1999.
  - Ohtaki S, Nakagawa H, Nakamura M, Yamazaki I. Reactions of purified hog thyroid peroxidase with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tyrosine and methylmercaptoimidazole (goitrogen) in comparison with bovine lactoperoxidase. *J Biol Chem* 257, 257-261, 1982.
  - O'Neill B, Magnolato D, Semenza G. The electrogenic Na<sup>+</sup> - dependent I<sup>-</sup> transport system in plasma membrane vesicles from thyroid glands. *Biochem Biophys Acta* 869, 263-274, 1987.
  - Ortiz L, Zannini M, Di Lauro R, Santisteban P. Transcriptional control of the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 by thyrotropin, insulin, and insulin-like growth factor I. *J Biol Chem* 272, 23334-23339, 1997.
  - Ortiz L, Aza-Blanc P, Zannini M, Cato AC, Santisteban P The interaction between the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 and the constitutive factor CTF/NF-1 is required for efficient hormonal regulation of the thyroperoxidase gene transcription. *J Biol Chem* 274, 15213-15221, 1999.
  - Pachucki J, Wang D, Christophe D, Miot F. Structural and functional characterization of the two human Thox/Duox genes and their 5-flanking regions. *Mol Cell Endocrinol* 214, 53-62, 2004.
  - Pan Q, Li C, Xiao J, Kimura S, Rubenstein J, Puelles L, Minoo P. In vivo characterization of the Nkx2.1 promoter/enhancer elements in transgenic mice. *Gene* 331, 73-82, 2004

- Pani L, Overdier DG, Porcella A, Qian X, Lai E, Costa RH. Hepatocyte Nuclear Factor 3i8 Contains Two Transcriptional Activation Domains, One Of Which Is Novel And Conserved With The Drosophila Fork Head Protein. *Mol Cell Biol* 12, 3723-3732, 1992.
- Panigraphy d., Kaipainen A., Huang S., Butterfield C. E., Barnes C. M., Fannon M., Laforme Andrea M., deviney M. Chopnis, Folkman J., Kieran M.W. PPARalpha agonist fenofibrate suppresses tumor growth through direct and indirect angiogenesis inhibition. *PNAS* 105, 985-990, 2008.
- Panneels V. Bergen V, Jacoby C, Braekman JC, Van Sande J, Dumont JE, Boeynaems JM. Inhibition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by iodoaldehydes in cultured dog thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol* 102, 167-176, 1994a.
- Panneels, V., Van Sande, J., Van den Bergen, H., Jacoby, C., Braekman, J.C., Dumont, J.E., & Boeynaems J.M.,. Inhibition of human thyroid adenyl cyclase by 2-iodoaldehydes. *Mol Cell Endocrinol* 106, 41-50, 1994b.
- Panneels V, Macours P, Van der Bergen H. Braekman JC, Van Sande J, Boeynaems JM. Biosynthesis and Metabolism of 2-Iodoheptadecanal in Cultured Dog Thyroid Cells. *J Biol Chem* 271, 23006-23014, 1996.
- Panneels V, Juvenal G, Boeynaems JM, Dumont JE, Van Sande J. En: *Comprehensive Handbook on Iodine: Nutritional, Endocrine and Pathological Aspects*. Eds V. R. Preedy, G. N. Burrow, R. Watson,, Oxford: Academic Press 303-314, 2009.
- Park JW, Zarnegar R, Kanauchi H, Wong MG, Hyun CW, Ginzinger DG, Lobo M, Cotter P, Duh QY., Clark H. Troglitazone, the peroxisome proliferators-activated receptor agonist, induces antiproliferation and redifferentiation in human thyroid cancer cell lines. *Thyroid* 15, 222-231, 2005.
- Pasca di Magliano M, Di Lauro R & Zannini M. Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation. *PNAS* 97, 13144-13149, 2000.
- Pendred V. Deaf mutism and goitre. *The Lancet* 148, 532, 1896.

- Pereira A, Braekman JC, Dumont JE, Boeynaems JM. Identification of major iodolipid from horse thyroid gland as 2-iodohexadecanal. *J Biol Chem* 265, 17018-17025, 1990.
- Perri A, Catalano S, Bonofiglio D, Vizza D, Rovito D, Qi H, Aquila S, Panza S, Rizza P, Lanzino M, Andò S. T3 enhances thyroid cancer cell proliferation through TR 1/Oct-1-mediated cyclin D1 activation. *Mol Cell Endocrinol* 382, 205-217, 2014.
- Perrone L, Pasca di Magliano M, Zannini M, Di Lauro R. The thyroid transcription factor 2 (TTF-2) is a promoter-specific DNA-binding independent transcriptional repressor. *Biochem Biophys Res Commun* 275, 203-208, 2000.
- Philips JC, Petite C, Willi JP, Buchegger F, Meier CA. Effect of peroxisome activated receptor  $\gamma$  agonist, rosiglitazone on dedifferentiated thyroid cancers. *Nuclear medicine Communications* 25, 1183-1186, 2004.
- Pierrou S, Hellqvist M, Samuelsson L, Enerback S, Carlsson P. Cloning and characterization of seven human forkhead proteins: binding site specificity and DNA bending. *The EMBO J* 13, 5002-5012, 1994.
- Pighetti GM, Novosad W, Nicholson C, et al. Therapeutic treatment of DMBA induced mammary tumors with PPAR ligands. *Anticancer Res* 21, 825-830, 2001.
- Pighetti GM, Novosad W, Nicholson C, Hitt DC, Hansens C, Hollingsworth AB, Lerner ML, Brackett D, Lightfoot SA, Gimble JM. Therapeutic treatment of DMBA-induced mammary tumors with PPAR ligands. *Anticancer Res.* 21, 825-829, 2001.
- Pisarev MA, Bocanera LV, Chester HA. Effect of iodoarachidonates on thyroid protein biosynthesis. *Acta Endocrinol* 82, 298-305, 1976.
- Pisarev MA. Thyroid autoregulation. *J Endocrinol Invest* 8, 475-484, 1985.
- Pisarev MA, Chazenbalk GD, Valsecchi RM. Thyroid autoregulation. Inhibition of goiter growth and cAMP formation in rat thyroid by iodinated derivatives of arachidonic acid. *J Endocrinol Invest* 1, 669-674, 1988.

- Pisarev MA, Bocanera LV, Chester HA, Kleiman de Pisarev DL, Juvenal GJ, Pregliasco LB, Krawiec L. Effect of iodoarachidonates on thyroid FRTL-5 cells growth. *Horm Metab Res* 24, 558-561, 1992.
- Pisarev MA, Kraviec L, Juvenal GJ. Studies on the goiter inhibition effects of iodolactones. *Eur J Pharmacol* 258, 33-37, 1994.
- Pisarev MA, Gartner R. Autoregulatory action of iodine. En: *The Thyroid*, 8th ed. Eds LE. Braverman & RD Utiger, Philadelphia: Lippincott 85-90, 2000.
- Plachov D, Chowdhury K, Walther C, Simon D, Guenet JL & Gruss P. Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development* 110, 643-651, 1990.
- Placzkowski K.A., Reddi H. V., Grebe S. K. G., Eerhardt N. L., McIver B. the Role of the PAX8/PPAR $\gamma$  fusion oncogene in thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol* 321, 50-56, 2010.
- Pregliasco L, Bocanera S, Kraviec L., Silberschmidt D., Pisarev M, Juvenal G.. Effects Of Iodine On Thyroglobulin Biosynthesis In FRTL-5 Cells. *Thyroid* 6, 319-323, 1996.
- Plisetskaya E, Woo NY, Murat JC. Thyroid hormones in cyclostomes and fish and their role in regulation of intermediary metabolism. *Comparative Biochem and Physiol* 74, 179-187, 1983.
- Poncin S, Gérard AC, Boucquey M, Senou M, Calderon PB, Knoop B, Lengelé B, Many MC, Colin IM. Oxidative stress in the thyroid gland: from harmlessness to hazard depending on the iodine content. *Endocrinol* 149, 424-433, 2008.
- Poleev A, Fickenscher H, Mundlos S, Winterpacht A, Zabel B, Fidler A, Gruss P & Plachov D PAX8, a human paired box gene: isolation and expression in developing thyroid, kidney and Wilms' tumors. *Development* 116, 611-623, 1992.
- Powell J G, Wang X, Allard B L, Sahin M, Wan X-Lg, Hay1 I D, Hiddinga1 H J, Deshpande S S, Kroll T G, Grebe SKG, Eberhardt N L, McIver B. The PAX8/PPAR $\gamma$  fusion oncoprotein transforms immortalized human

- thyrocytes through a mechanism probably involving wild-type PPAR $\gamma$  inhibition. *Oncogene* 23, 3634-3641, 2004.
- Rabinowitz JI y Tavares CJ. Iodinated Phospholipids And The In Vitro Iodination Of Proteins Of Dog Thyroid Gland. *Biochem. J.* 168, 155-160, 1977.  
Reardon W, Trembath RC. Pendred syndrome. *J Med Gen* 33, 1037-1040, 1996.
  - Riedel C, Levy O, Carrasco N. Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. *J Biol Chem* 276, 21458-21463, 2001.
  - Rigutto S, Hoste C, Grasberger H, Milenkovic M, Communi D, Dumont J E, Corvilain B, Miot F, De Deken X. Activation of Dual Oxidases Duox1 and Duox2 Differential Regulation Mediated By Camp-Dependent Protein Kinase And Protein Kinase C-Dependent Phosphorylation. *J Biol Chem* 284, 6725-6734, 2009.
  - Rivolta, Moya, Esperante, Gutnisky, Varela, Targovnik. La tiroides como modelo de enfermedades genéticas. *Medicina* 65, 257-267, 2005.
  - Rivolta CM, Louis-Tisserand M, Varela V, Gruneiro-Papendieck L, Chiesa A, Gonzalez- Sarmiento R, Targovnik HM. Two compound heterozygous mutations (c.215delA/c.2422T-->C and c.387delC/c.1159G-->A) in the thyroid peroxidase gene responsible for congenital goitre and iodide organification defect. *Clin Endocrinol* 67, 238-246, 2007.
  - Rodriguez AM, Peron B, Lacroix L, Caillou B, Leblanc G, Schlumberger M, Bidart JM, Pourcher T. Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *J Clinical Endocrinol Metab* 87, 3500-3503, 2002.
  - Rognoni JB, Penel C, Ducret F. Respectives roles of circulatorin T4 and T3 in control of TSH secretion in severely iodide-deficient rats. *Acta Endocrinol* 105, 40-48, 1984.
  - Rösner H, Torremante P, Möller W, Gärtner R. Antiproliferative/cytotoxic activity of molecular iodine and iodolactones in various human carcinoma



- cell lines. No interfering with EGF-signaling, but evidence for apoptosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 118, 410-419, 2010.
- Rousset BA, Dunn JT. Thyroid hormone synthesis and secretion. In: DeGroot LE, Hannemann G, eds. *The Thyroid and Its Diseases*, 2004. Internet: <http://www.thyroidmanager.org/Chapter2/2-frame.htm>. Accessed September 9, 2008.
  - Royaux IE, Suzuki K, Mori A. Pendrin, the protein encoded by Pendred Syndrome gene (PDS), is an apical porter iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinol* 141, 839-845, 2000.
  - Ruf J, Carayon P Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. *Arch Biochem Biophys* 445, 269-277, 2006.
  - Saito T, Endo T, Nakazato M, Kogai T, Onaya T. Thyroid-Stimulating Hormone-Induced Down-Regulation Of Thyroid Transcription Factor 1 In Rat Thyroid Frtl-5 Cells. *Endocrinol* 138, 602-606, 1997.
  - Salvarredi L, Thomasz L, Rossich L, Saiselet M, Pisarev MA, Fusco A, Juvenal GJ. 2-iodohexadecanal inhibits thyroid cell growth in part through the induction of let-7f microRNA. *Mol Cell Endocrinol* 414, 224-232, 2015.
  - Santisteban Pilar. Development and anatomy of hypothalamic-pituitary-thyroid axis, in *The Thyroid*, 9<sup>Th</sup> Edition, LE Braverman & RD Utiger, eds., Lippincott USA, 9-23, 2005.
  - Schwabe JW, Neuhaus D Rhodes D. Solution structure of the DNA-binding domain of oestrogen receptor. *Nature* 348, 458-461, 1990.
  - Scipioni A, Ferretti E, Soda G, Tosi E, Bruno R, Costante G, Meringolo D, Arturi F, Durante C, Amorosi A, Foschini MP, Nardi F, Russo D, Filetti S. hNIS protein in thyroid: the iodine supply influences its expression and localization. *Thyroid* 17, 613-8, 2007.
  - Scott DA, Karniski LP. Human pendrin expressed in *Xenopus laevis* oocytes mediates chloride/formate exchange. *Am J Physiol* 278, 207–211, 2000.

- Sellitti DF, Suzuki K. Intrinsic regulation of thyroid function by thyroglobulin. *Thyroid* 24, 625-38, 2014.
- Serrano-Nascimento C, Calil-Silveira J, Nunes MT. Posttranscriptional regulation of sodium-iodide symporter mRNA expression in the rat thyroid gland by acute iodide administration. *Am J Physiol Cell Physiol* 298, 893-899, 2010.
- Serrano-Nascimento C, Calil-Silveira J, Goulart-Silva F, Nunes MT. New insights about the posttranscriptional mechanisms triggered by iodide excess on sodium/iodide symporter (NIS) expression in PCCl3 cells. *Mol Cell Endocrinol* 349, 154-161, 2012.
- Serrano-Nascimento C, Nicola JP, Teixeira SD, Poyares LL, Lellis-Santos C, Bordin S, Masini-Repiso AM, Nunes MT. Excess iodide downregulates Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene transcription through activation of PI3K/Akt pathway. *Mol Cell Endocrinol* 426, 73-90, 2016
- Shi YB, Ritchie JW, Taylor PM. Complex regulation of thyroid hormone action: multiple opportunities for pharmacological intervention. *Pharmacol Theraphy* 94, 235-251, 2002.
- Shimura H, Okajima F, Ikuyama S, Shimura Y, Saji M, Kohn LD. Thyroid-specific expression of the thyrotropin receptor promoter and autoregulation of the thyrotropin receptor gene by cAMP involves thyroid transcription factor-1 (TTF-1). *Mol Endocrinol* 8, 1049-1069, 1994.
- Shimura H, Suzuki H, Miyazaki A, Furuya F, Ohta K, Haraguchi K, Endo T, Onaya T. Transcriptional Activation of the Thyroglobulin Promoter Directing Suicide Gene Expression by Thyroid Transcription Factor-1 in Thyroid Cancer Cells. *Cancer Research* 61, 3640-3646, 2001.
- Shaw-White JR, Bruno MD, Whitsett JA. GATA-6 activates transcription of thyroid transcription factor-1. *J Biol Chem* 274, 2658-2664, 1999.
- Smerdely P, Pitsiavas V, Boyages SC. The G2M arrest caused by iodide is unrelated to the effects of iodide at adenylate cyclase. *Thyroid* 5, 325-330, 1995.

- Song Y, Massart C, Chico-Galdo V, Jin L, De Maertelaer V, Decoster C, Dumont J.E., Van Sande J. Species specific thyroid signal transduction: Conserved physiology, divergent mechanisms. *Mol and Cell Endocrinol* 319, 56-62, 2010-a.
- Song Y, Ruf J, Lothaire P, Dequanter D, Andry G, Willemse E, Dumont JE, Van Sande J, De Deken X. Association of Duoxes with Thyroid Peroxidase and Its Regulation in Thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 375-382, 2010-b.
- Spitzweg C, Joba W, Morris JC, Heufelder AE. Regulation of sodium iodide symporter gene expression in FRTL-5 rat thyroid cells. *Thyroid* 9, 821-830, 1999.
- St Germain DL, Galton VA, Hernandez A Minireview: Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. *Endocrinol* 150, 1097-1107, 2009.
- Stapleton P, Weith P, Urbanek P, Kozmik, Busslinger M. Chromosomal localization of seven PAX genes and cloning of a novel family member, PAX-9. *Nature Genet* 3, 292-298, 1993.
- Stephen RL, Gustafsson MC, Jarvis M, et al. Activation of peroxisome proliferators activated receptor delta stimulates the proliferation of human breast and prostate cancer cell lines. *Cancer Research* 64, 3162-3170, 2004.
- Sue M, Akama T, Kawashima A, Nakamura H, Hara T, Tanigawa K, Wu H, Yoshihara A, Ishido Y, Hiroi N, Yoshino G, Kohn LD, Ishii N, Suzuki K. Propylthiouracil increases sodium/iodide symporter gene expression and iodide uptake in rat thyroid cells in the absence of TSH. *Thyroid* 22, 844-852, 2012.
- Suzuki K, Lavaroni S, Mori A, Ohta M, Saito J, Pietrarello M, Singer DS, Kimura S, Katoh R, Kawaoi A, Kohn LD. Autoregulation of thyroid-specific gene transcription by thyroglobulin. *PNAS* 95, 8251-8256, 1998.
- Suzuki K, Kimura H, Wua H, Kudo N Kim, WB, Suzuki S, Yoshida A, Caturegli P, Kohn L. Excess iodide decreases transcription of NIS and

- VEGF genes in rat FRTL-5 thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 393, 286-290, 2010.
- Taki K, Kogai T, Kanamoto Y, Hershman JM., Brent GA.. A Thyroid-Specific Far-Upstream Enhancer in the Human Sodium/Iodide Symporter Gene Requires Pax-8 Binding and Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Response Element-Like Sequence Binding Proteins for Full Activity and Is Differentially Regulated in Normal and Thyroid Cancer Cells. *Mol Endocrinol* 16, 2266-2282, 2002.
  - Taurog A. Hormone synthesis: thyroid iodine metabolism. En: *the thyroid*, 8 Th ed. Eds: Braverman LE, Utiger RD. Philadelphia: Lippincott, 61-85, 2000.
  - Tenenbaum-Rakover Y, Mamanasiri S, Ris-Stalpers C, German A, Sack J, Allon-Shalev S, Pohlenz J, Refetoff S. Clinical and genetic characteristics of congenital hypothyroidism due to mutations in the thyroid peroxidase (TPO) gene in Israelis. *Clin Endocrinol* 66, 695-702, 2007.
  - Tepmongkol S, Keelawat S, Honsawek S, Ruangvejvorachai P. Rosiglitazone effect on radioiodine uptake in thyroid carcinoma patients with high thyroglobulin but negative total body scan: a correlation with the expresión of peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Thyroid* 18, 697-704, 2008.
  - Thomasz L, Oglio R, Dagrosa A, Krawiec L, Pisarev M, Juvenal G. Biochemical Changes During Goiter Induction by Methylmercaptoimidazol and Inhibition by 6-Iodolactone in Rat. *Thyroid* 9, 1003-1013, 2010 a.
  - Thomasz L, Oglio R, Toro-Rivandeira D, Dagrosa A, Jahn G, Pignataro O, Sartorio G, Pisarev M, Juvenal, G. 6 Iodo-delta-lactone reproduces many but not all the effects of iodide. *Mol Cell Endocrinol* 323, 161-166, 2010 b.
  - Thomasz L, Oglio R, Rossich L, Villamar S, Perona M, Salvarredi L, Dagrosa A, Pisarev MA, Juvenal GJ. 6 Iodo-delta-lactone: A derivate of arachidonic acid with antitumor effects in HT-29 colon cancer cells. *Prostaglandin, leukotrienes and Essential Fatty acids* 88, 273-280, 2013.

- Thomasz L, Coulonval K, Salvarredi L, Oglio R, Fusco A, Rossich L, Pisarev MA, Roger PP, Juvenal GJ. Inhibitory effects of 2-iodohexadecanol on FRTL-5 thyroid cells proliferation. *Mol Cell Endocrinol* 404, 123-131, 2015.
- Toonen RF, Gowan S, Bingle CD. The lung enriched transcription factor TTF-1 and the ubiquitously expressed proteins Sp1 and Sp3 interact with elements located in the minimal promoter of the rat Clara cell secretory protein gene. *Biochem J* 316, 467-473, 1996.
- Uyttersprot N, Pelgrims N, Carrasco N, Gervy C, Maenhaut C, Dumont JE, Miot F. Moderate doses of iodide in vivo inhibit cell proliferation and the expression of thyroperoxidase and  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  symporter mRNAs in dog thyroid. *Mol Cell Endocrinol* 131, 195-203, 1997.
- Vadysirisack DD, Chen ES, Zhang Z, Tsai MD, Chang GD, Jhiang SM. Identification of in vivo phosphorylation sites and their functional significance in the sodium iodide symporter. *J Biol Chem* 282, 36820-36828, 2007
- Van Heuverswyn B, Streydio C, Brocas H, Refetoff S, Dumont JE, Vassart G. Thyrotropin controls transcription of thyroglobulin gene. *PNAS* 1307, 97-103, 1996.
- Van Renterghem P, Dremier S, Vassart G, Christophe D. Study of TTF-1 gene expression in dog thyrocytes in primary culture. *Mol Cell Endocrinol* 112, 83-93, 1995.
- Van Renterghem P, Vassart G, Christophe D. Pax-8 expression in primary cultured dog thyrocyte is increased by cyclic AMP. *Biochim Biophys Acta* 1307, 97-103, 1996.
- Van Sande J, Grenier G, Willems C, Dumont JE. Inhibition by iodide of the activation of the thyroid cyclic 3',5'-AMP system. *Endocrinol* 96, 781-786, 1975.
- Van Sande J, Raspe E, Perret J, Lejeune C, Maenhaut C, Vassar G. Thyrotropin activates both the cyclic AMP and the PIP2 cascades in CHO

- cells expressing the human cDNA of TSH receptor. *Mol Cell Endocrinol* 74, 7-6, 1990.
- Varela V, Rivolta CM, Esperante SA, Gruneiro-Papendieck L, Chiesa A, Targovnik HM. Three mutations (p.Q36H, p.G418fsX482, and g.IVS19-2A C) in the dual oxidase 2 gene responsible for congenital goiter and iodide organification defect. *Clin Chem* 52, 182-191, 2006.
  - Vassart G, Dumont JE. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocrinol Rev* 13, 596-611, 1992.
  - Virion A, Courtin F, Deme D, Michot JL, Kaniewski J, Pommier J. Spectral characteristics and catalytic properties of thyroid peroxidase- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compounds in the iodination and coupling reactions. *Arch Biochem Biophys* 242, 41-47, 1985.
  - Visser WE, Friesema EC, Jansen J, Visser TJ. Thyroid hormone transport in and out of cells. *Trends Endocrinol Metab* 19, 50-56, 2008.
  - Wahli W. & Martinez E. Superfamily of steroid nuclear receptors: positive and negative regulators of gene expression. *Faseb J* 5, 2243-2249, 1991.
  - Wahli W, Braissant O, Desvergne B. Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more. *Chem Biol* 2, 261-266, 1995.
  - Walther SJ, Guenet JL, Simon D, deusch U, Jostes B, Goulding MD, Plachov D, Balling R, Gruss P. Pax: a murine multigene family paired box-containing genes. *Genomics* 11, 424-434, 1991.
  - Weiss SJ, Philip NJ, Ambesi-Impibato FS. Thyrotropin stimulated iodide transport mediated by adenosine 3'-5' monophosphate and dependent on protein synthesis. *Endocrinol* 114, 1099-1107, 1984.
  - Werion A, Joris V, Hepp M, Papasokrati L, Marique L, de Ville de Goyet C, Van Regemorter V, Mourad M, Lengelé B, Daumerie C, Marbaix E, Brichard S, Many MC, Craps J. Pioglitazone, a PPAR Agonist, Upregulates the Expression of Caveolin-1 and Catalase, Essential for Thyroid Cell Homeostasis: A Clue to the Pathogenesis of Hashimoto's Thyroiditis. *Thyroid* 26, 1320-1331, 2016.

- Wolfe HJ, Voelkel EF, Tashjian JA. Distribution of calcitonin-containing cells in the normal adult human thyroid gland: a correlation of morphology with peptide content. *J Clin Endocrinol Metab* 41, 1076-1081, 1974.
- Wolff J., Chaikoff I.L., Goldberg R.C. The temporary nature of inhibitory action of excess iodide on organic iodide synthesis in normal thyroid. *Endocrinol* 45, 504-513, 1949.
- Yamada H, Takano T, Matsuzuka F, Watanabe M, Miyauchi A, Iwatani Y. Transcriptional activity of the 5'-flanking region of the thyroid transcription factor-1 gene in human thyroid cell lines. *Genetics and Mol Biol* 34, 6-10, 2011.
- Yan C, Sever Z, Whitsett JA. Upstream enhancer activity in the human SP-B gene is mediated by TTF-1. *J Biol Chem* 270, 24855-24857, 1995.
- Yaoita Y, Shi YB, Brown DD. *Xenopus laevis* alpha and beta thyroid hormone receptors. *PNAS* 87, 7090-7094, 1990.
- Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 81, 281-191, 2001.
- Yin F, Wakino S, Liu Z. Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 916-922, 2001.
- Yin Y, Russell RG, Dettin LE. Peroxisome proliferator-activated receptor and agonists differentially alter tumor differentiation and progression during mammary carcinogenesis. *Cancer Research* 65, 3950-3957, 2005.
- Yoshida A, Taniguchi S, Hisatome I, Royaux IE, Green ED, Kohn LD, Suzuki K. Pendrin is an iodide specific apical porter responsible for iodide efflux from thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3356-3361, 2002.
- Yuasa R, Eggo MC, Meinkoth J, Dillmann WH, Burrow GN. Iodide induces transforming growth factor beta1 mRNA in sheep thyroid cells. *Thyroid* 2, 141-145, 1992.
- Zannini M, Avantaggiato V, Biffali E, Arnone MI, Sato K, Pischetola M, Taylor BA, Phillips SJ, Simeone A, Di Lauro R. TTF-2, a new forkhead

protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. EMBO J 16, 3185-3197, 1997.



## **Publicaciones**

### **PUBLICACIONES RELACIONADAS AL PRESENTE TRABAJO DE TESIS**

#### **2-iodohexadecanal effects in the physiology of thyroid cells.**

**Luciano E Rossich**, Lisa Thomasz, Juan P Nicola, Magalí Nazar, Leonardo A Salvarredi, Mario A Pisarev, Ana M Masini-Repiso, Christine Christophe-Hobertus Daniel Christophe, Guillermo J Juvenal.

Molecular and Cellular Endocrinology 437, 292-301, 2016.

### **PUBLICACIONES COMO CO-AUTOR DURANTE EL TRANCURSO DE ESTA TESIS**

#### **Inhibitory effects of 2-iodohexadecanal on FRTL-5 thyroid cells proliferation.**

Lisa Thomasz , Katia Coulonval , Leonardo Salvarredi , Romina Oglio , Alfredo Fusco , **Luciano E Rossich** , Mario A. Pisarev , Pierre P. Roger , Guillermo J. Juvenal .

Molecular and Cellular Endocrinology 404, 123-131, 2015.

#### **2-iodohexadecanal inhibits thyroid cell growth in part through the induction of let-7f microRNA.**

Leonardo A. Salvarredi, Lisa Thomasz, **Luciano E Rossich**, Manuel Saiselet , Mario A. Pisarev, Alfredo Fusco, Guillermo J. Juvenal.

Molecular and Cellular Endocrinology 414, 224-232, 2015.

#### **6 Iodo-d-lactone: A derivative of arachidonic acid with antitumor effects in HT-29 colon cancer cells.**

Lisa Thomasz, Romina Oglio, **Luciano E Rossich**, Sonia Villamar, Marina Perona, Leonardo Salvarredi, Alejandra Dagrosa, Mario A. Pisarev, Guillermo J. Juvenal.

Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 88 , 273-280, 2013.

**En la búsqueda del “Eslabón perdido” en la acción del iodo sobre la célula tiroidea.**

Lisa Thomasz, **Luciano E Rossich**, Romina Oglio, María Alejandra Dagrosa, Mario Alberto Pisarev, Guillermo Juan Juvenal.

Glánd Tir Paratir 20, 8-13, 2011.

**Thyroid: Iodine Beyond the Thyronines.**

Guillermo J. Juvenal, Lisa Thomasz, Romina Oglio, Marina Perona, Mario A. Pisarev, **Luciano E Rossich**, Leonardo Salvarredi.

Current Chemical Biology 5, 163-167, 2011.